

DIEGO ISMAEL ROCHA

**ESTUDOS ANATÔMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE SISTEMAS DE
REGENERAÇÃO *in vitro* DE *Passiflora cincinnata* MASTERS E *Passiflora edulis* SIMS
(PASSIFLORACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

DIEGO ISMAEL ROCHA

**ESTUDOS ANATÔMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE SISTEMAS DE
REGENERAÇÃO *in vitro* DE *Passiflora cincinnata* MASTERS E *Passiflora edulis* SIMS
(PASSIFLORACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka
(Coorientador)

Prof^a. Dra. Luzimar Campos da Silva
(Coorientadora)

Dra. Andréa Dias Koehler

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Aos meus pais,

José Benedito (in memoriam), Ana Maria e Paulo Zanoni

Aos meus conselheiros e amigos,

Luzimar Campos da Silva e Wagner Campos Otoni,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial, ao Departamento de Biologia Vegetal, pela realização do curso e deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Prof. Wagner Campos Otoni, pela amizade, ensinamentos, cumplicidade e, principalmente, pela confiança em mim depositada. Agradeço também por ser um exemplo de caráter, dedicação e humildade, inspirando a todos que tem o prazer de trabalhar ao seu lado.

À Prof^a Luzimar Campos da Silva. Palavras não são suficientes para descrever minha admiração e gratidão. Agradeço por todo carinho, ensinamentos, conversas, conselhos, orientações, enfim, pela amizade sincera e todo zelo.

Ao Prof. Francisco André Ossamu Tanaka, pela amizade, orientação e paciência ao me ensinar praticamente tudo que sei sobre microscopia eletrônica.

À Prof^a. Aristéa Alves Azevedo, pelos ensinamentos, carinho e convívio mais que agradável. Assim como pela confiança e pelo empréstimo de materiais imprescindíveis para a realização desse estudo.

À Prof^a. Renata Maria Strozi Alves Meira, pelos ensinamentos, carinho, boas risadas, disponibilidade e pelas valiosas “trocas de idéias”. Agradeço também pela confiança e pela oportunidade de executar meu primeiro projeto de Iniciação Científica, sob sua orientação.

À Prof^a Marília Contin Ventrella, pela amizade, agradável convívio e ensinamentos.

A todos os demais professores do Programa de Pós-graduação em Botânica (UFV) pelos valiosos ensinamentos.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Botânica e do Departamento de Biologia Vegetal, em especial, ao Ângelo, Francine, Nívea e Celso.

À Karla Veloso, Patrícia e Gilmar Valente do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, pelo suporte dado para a realização da microscopia eletrônica, em especial ao Dr. Elliot Kitajima, Renato Salaroli e todos os estagiários pelo agradável convívio.

Aos meus estagiários Mariana e Anderson, pela vivência e dedicação.

Aos companheiros do laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII) por sempre tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso, descontraído e alegre. Agradeço também pela disponibilidade e auxílio de todos vocês durante a realização do meu trabalho.

Aos amigos do mestrado e do laboratório de Anatomia Vegetal pelos ótimos anos de convivência e por proporcionarem sempre bons momentos.

À Lorena Melo Vieira, grande parceira e amiga. Agradeço por toda ajuda, dentro e fora do laboratório. Você é uma pessoa muito especial e espero ter o enorme prazer de trabalhar ao seu lado novamente.

À Dayana Maria Teodoro Francino, ao Bruno Francisco Sant’Anna-Santos, à Ana Claudia Ferreira da Cruz e à Lourdes Iarema, pessoas que levo no coração. Obrigado por todo carinho, conversas e todos os conselhos, tão importantes para minha vida profissional e pessoal. Vocês são grandes amigos.

A todos, atuais e antigos, integrantes da minha família viçosense, república Carroça. Obrigado por todos os momentos maravilhosos que vivemos.

À Mariana Fonseca Machado, pelo amor, carinho, atenção e pelo apoio incondicional durante todo o mestrado. Você é uma pessoa maravilhosa e agradeço a Deus por ter lhe colocado ao meu lado.

Às minhas queridas irmãs Damila e Dirliane que tanto amo. Obrigado por me ensinarem a aproveitar a vida e mesmo nos momentos difíceis a extrair o que há de proveitoso.

Ao Paulo Zanoni, “Paulão”, pelas sábias palavras me ditas em momentos de dificuldade. Obrigado por ser esse pai tão amoroso e cuidadoso com toda nossa família.

Ao meu pai José Benedito, “Rochinha”, *in memoriam*, que tanto me ensinou e tanta falta me faz. Tenho certeza que, onde quer que esteja, está feliz com esse momento tão especial.

À minha mãe, Ana Maria Ismael Zanoni, fonte de inspiração que seguirei por toda vida. Amo você!!!!

Ao meu senhor Jesus por tudo, mas principalmente por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida!

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Diego Ismael Rocha, filho de José Benedito Rocha e Ana Maria Ismael Rocha, nasceu em Belo Horizonte, MG, em 21 de março de 1986.

Cursou o ensino médio no colégio Frei Orlando II, em Belo Horizonte, MG, concluindo em 2003.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004, e concluiu o curso de Agronomia em janeiro de 2009.

Foi bolsista de Iniciação Científica durante três anos, desenvolvendo projetos no laboratório de Anatomia Vegetal, de 2006 a 2009.

Em 2008 foi agraciado com o Prêmio Verde, concedido pela Sociedade Botânica do Brasil durante o 59º Congresso Nacional de Botânica, pela apresentação do trabalho “Morfoanatomia, ontogenia e química da secreção dos nectários extraflorais de *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae)”.

Em 2009 iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de regeneração *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora cincinnata* Masters (Passifloraceae)”, em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: Alterações histocitológicas em cotilédones de <i>Passiflora cincinnata</i> Masters (Passifloraceae) durante o processo de embriogênese somática	
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	
Indução de embriogênese somática	10
Preparação das amostras para análises microscópicas	11
Microscopia de luz e caracterização histoquímica	11
Microscopia eletrônica de varredura	12
Microscopia eletrônica de transmissão	12
RESULTADOS	
Desenvolvimento dos embriões somáticos	12
Caracterização histoquímica	14
Aspectos ultraestruturais	14
DISCUSSÃO	
Alterações estruturais durante a embriogênese somática	15
Aspectos ultraestruturais e mobilização de reservas	17
AGRADECIMENTOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO 2: Organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) a partir de explantes radiculares: aspectos anatômicos e ultraestruturais

RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	
Material vegetal e indução de organogênese <i>in vitro</i>	34
Preparação das amostras para análises microscópicas	35
Microscopia de luz	35
Microscopia eletrônica de varredura	35
Microscopia eletrônica de transmissão	36
RESULTADOS	
Estudos anatômicos e micromorfológicos	36
Aspectos ultraestruturais	37
DISCUSSÃO	38
AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
FIGURAS	45
4. CONCLUSÕES GERAIS	48
FIGURAS	26

RESUMO

ROCHA, Diego Ismael, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de regeneração *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Luzimar Campos da Silva e Francisco André Ossamu Tanaka.

O presente estudo teve como objetivo descrever, através de análises anatômicas e ultraestruturais, o processo de regeneração *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Masters, via embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos e de *Passiflora edulis* Sims, via organogênese, a partir de explantes radiculares. Embriões zigóticos maduros de *P. cincinnata* foram colocados em meio de indução MS suplementado com 18,1 μM de 2,4-D e 4,4 μM de BAP. Embriões somáticos originaram-se a partir de zonas pró-embriogênicas que se diferenciaram nas camadas periféricas de protuberâncias formadas pela proliferação meristemática de células da protoderme e do meristema fundamental dos cotilédones. As zonas pró-embriogênicas eram constituídas por um grupo de células individualizadas, indicando o padrão de origem multicelular dos embriões somáticos. Essas células apresentaram núcleos volumosos, citoplasma denso com predominância de mitocôndrias, dictiossomos e poucos compostos de reserva. Nos estádios iniciais do processo embriogênico, as células não embriogênicas apresentaram grãos de amido, compostos não observados no explante inicial, indicando síntese *de novo*. Menores quantidades de lipídeos e proteínas de reserva também foram notadas nessa fase. No processo de organogênese *in vitro*, explantes radiculares de *P. edulis* foram cultivados em meio de indução MS, suplementado com 2,35 μM de BA. Os padrões de regeneração direta e indireta foram observados. Na organogênese direta, meristemoides foram formados a partir de células do periciclo ou do câmbio vascular, dependendo do estágio de desenvolvimento do explante. Na organogênese indireta, meristemoides foram formados nas camadas periféricas dos calos, que por sua vez se diferenciaram da região cortical do explante. Meristemoides formados via sistema direto apresentaram núcleos esféricos com um ou mais nucléolos proeminentes, características não visualizadas naqueles formados indiretamente, que possuíam núcleos lobados com complexos de poros nucleares evidentes. Os resultados relatados no presente trabalho constituem informações importantes para o entendimento dessas vias morfogênicas em *Passiflora*, subsidiando investigações relacionadas à caracterização de eventos moleculares nesses sistemas de regeneração, bem ainda para estudos que visem à utilização desses sistemas em protocolos de transformação genética dessas espécies.

ABSTRACT

ROCHA, Diego Ismael, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Anatomy and ultrastructure of *in vitro* regeneration systems of *Passiflora cincinnata* Masters and *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva and Francisco André Ossamu Tanaka.

This study aimed to describe, using anatomical and ultrastructural analysis, the process of *in vitro* regeneration of *Passiflora cincinnata* Masters via somatic embryogenesis from zygotic embryos and *Passiflora edulis* Sims via organogenesis from root explants. Mature zygotic embryos of *P. cincinnata* were placed on MS induction medium supplemented with 18.1 μ M 2,4-D and 4.4 μ M BAP. Somatic embryos originated from pro-embryogenic zones that differentiated in the peripheral layers of protuberances formed by the meristematic proliferation of cells of the protoderm and ground meristem of cotyledons. The pro-embryogenic zones were formed by a group of individual cells, showing the multicellular origin of somatic embryos. These cells had large nuclei, dense cytoplasm with predominance of mitochondria, dictyosomes and a few reserve compounds. In the initial stages of embryogenesis, non-embryogenic cells had starch grains, which was not found in the starting explant, indicating *de novo* synthesis. Lesser amounts of lipids and storage proteins have also been found in this stage. In the *in vitro* organogenesis, root explants of *P. edulis* were cultured on MS induction medium supplemented with 2.35 μ M BA. Direct and indirect regeneration patterns were recorded. In direct organogenesis, meristemoids were formed from cells of the cambium or pericycle, depending on the developmental stage of the explant. In indirect organogenesis, meristemoids were formed in the peripheral layers of the callus, which in turn differentiated from the cortical region of the explant. Meristemoids formed via direct system had spherical nuclei with one or more prominent nucleoli. These characteristics were not visualized in meristemoids formed via indirect system, which had lobed nuclei with evident nuclear pore complexes. The findings reported in this work are relevant to a better understanding of these morphogenetic pathways in *Passiflora*, providing insight into the characterization of molecular events in these regeneration systems, as well as studies aiming at the use these systems in genetic transformation protocols for the studied species.

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies de *Passiflora* apresentam reconhecida importância econômica devido ao valor nutricional de seus frutos, propriedades farmacêuticas e o valor ornamental de suas flores. Esse gênero compreende cerca de 4 subgêneros e 650 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Ulmer e MacDougal 2004). Dentre essas, somente duas espécies são cultivadas comercialmente no Brasil: *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro azedo) e *Passiflora alata* (maracujazeiro doce).

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção mundial de maracujá, chegando a produzir 615.196 toneladas em uma área de produção de 45.330 hectares (IBGE 2006). No entanto, a suscetibilidade dessas espécies ao potyvirus *Cowpea aphid borne virus* (CABMV) e à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, tem limitado a produção dos frutos e a expansão da cultura (Zerbini et al. 2008).

Como alternativas, técnicas de biologia molecular, cultivo de tecidos e transformação genética tem sido empregadas para o controle de doenças causadas por bactérias e vírus em Passifloraceae (Vieira e Carneiro 2004; Trevisan et al. 2006; Zerbini et al. 2008). Métodos de propagação *in vitro* são úteis em programas de melhoramento genético, possibilitando o suprimento constante e homogêneo de material vegetal com elevada qualidade sanitária, embora, requeiram também, métodos eficientes para a regeneração de plantas *in vitro* (Yang et al. 2010).

Existem duas vias principais de morfogênese *in vitro*: a embriogênese somática e a organogênese. A embriogênese somática é caracterizada pela formação de uma estrutura bipolar, no qual seus domínios (meristemas apicais caulinares e radiculares) são formados num único eixo e temporalmente sincronizados. Na organogênese *in vitro*, o desenvolvimento de espécies vegetais ocorre em dois estádios, uma vez que a organização dos domínios apicais apresenta uma separação temporal (Peres 2002). Entre essas vias, a embriogênese somática é mais promissora à organogênese dado ao elevado número de regenerantes e um nível limitado de variação somaclonal (Gaj 2001; Paim Pinto et al. 2010).

Em *Passiflora*, a organogênese é a principal via, sendo usados explantes meristemáticos como segmentos nodais (Kantharajah e Dodd 1990; Drew 1991; Reis et al. 2003; Pipino et al. 2008) e ápices caulinares (Faria e Segura 1997; Barbosa et al. 2001; Isutsa 2004) ou não meristemáticos como fragmentos cotiledonares e hipocotiledonares (Dornelas e Vieira 1994; Hall et al. 2000; Fernando et al. 2007; Dias et al. 2009), discos foliares

(Appezzato-da-Glória et al. 1999; Otahola 2000; Becerra et al. 2004; Trevisan e Mendes 2005; Pinto et al. 2010) e segmentos de raízes (Lombardi et al. 2007; Silva 2009).

Recentemente, um protocolo de regeneração *in vitro* via embriogênese somática, foi estabelecido para *P. cincinnata* (Silva et al. 2009). Embora seja uma espécie silvestre, não cultivada comercialmente, é um genótipo de interesse devido às suas características de vigor e tolerância à seca, à nematoides (*Meloidogyne* sp.) e à bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) (Oliveira e Ruggiero 2005). Protocolos de propagação e regeneração *in vitro* para espécies silvestres de *Passiflora* tem sido desenvolvidos, uma vez que essas apresentam características potenciais para serem utilizadas em programas de melhoramento genético, em termos de rendimento, qualidade dos frutos e resistência a pragas e doenças (Junqueira et al. 2005; Vieira e Carneiro 2004; Zerbini et al. 2008). Contudo, apesar de diversos protocolos estarem disponíveis, tanto para espécies silvestres quanto para espécies cultivadas, a baixa frequência de regeneração e alongamento de gemas tem impossibilitado o uso rotineiro da micropropagação de *Passiflora* spp. (Trevisan et al. 2006; Zerbini et al. 2008).

O estudo do desenvolvimento de sistemas de regeneração, sob aspecto citológico, podem auxiliar a otimizar a eficiência do mesmo (Almeida et al. 2006), bem como, na seleção e validação desses sistemas para serem utilizados em protocolos de transformação genética. Essas informações podem contribuir para o estabelecimento dos parâmetros físicos da transformação por biobalística como posicionamento dos explantes e direcionamento do bombardeamento de partículas (Lenis-Manzano et al. 2010). Em *Passiflora*, é bem estabelecido que meristemoides localizados na superfície do explante apresentam maiores chances de serem transformados, quando mediado por *Agrobacterium*, em relação à meristemoides formados internamente (Biasi et al. 2000). Assim, torna-se imprescindível caracterizar o desenvolvimento e identificar as células envolvidas no processo morfogênico.

A caracterização citológica de meristemoides formados a partir de discos foliares de *P. edulis* foi crucial para compreensão da baixa taxa regeneração de gemas obtidas por esse sistema (Fernando et al. 2007). Em *P. alata*, análises anatômicas também foram preponderantes para se entender os problemas de alongamento de gemas em explantes foliares que, morfológicamente, apresentaram-se responsivos (Pinto et al. 2010).

Características ultraestruturais de células envolvidas no processo morfogênico tem sido associadas à variações genéticas, comumente observadas em plantas cultivadas e mantidas *in vitro*. Em *Bauhinia forficata*, meristemoides formados a partir de calos organogênicos apresentaram fragmentos de cromatina dispersa no citoplasma, indicando a ocorrência de amitose (Appezzato-da-Glória e Machado 2004). Fragmentação nuclear também foi observada em meristemoides originados de hipocótilos, via organogênese

indireta, em *P. edulis* (Fernando et al. 2007). A ocorrência de amitoses, possivelmente, apresenta implicações na estabilidade genética de regenerantes primários, podendo limitar o emprego do sistema de regeneração utilizado. Esses estudos ressaltam assim, a necessidade de análises ultraestruturais para caracterizar os processos de regeneração *in vitro*.

Dada a importância do entendimento dos mecanismos envolvidos na indução de competência celular à organogênese ou embriogênese, análises histológicas e ultraestruturais dos processos de regeneração *in vitro* tornam-se necessárias para melhor compreensão, otimização e validação do seu uso em protocolos de transformação genética.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Descrever o processo de diferenciação de células ou grupo de células envolvidas na formação de embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora cincinnata* Masters;
2. Monitorar, a partir de estudos histoquímicos e ultraestruturais, a mobilização de reservas durante o processo de embriogênese somática em *P. cincinnata*;
3. Caracterizar o desenvolvimento de meristemoides de *Passiflora edulis* Sims, população FB-100 Maguary, obtidos a partir de explantes radiculares, comparando a organogênese direta e indireta através de análises anatômicas e ultraestruturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida WAB, Mourão Filho FAAW, Mendes BMJ, Rodriguez, APM (2006) Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum* 50:321-325
- Appezzato-da-Glória B, Vieira MLC, Dornelas MC (1999) Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:2007-2013
- Appezzato-da-Glória B, Machado SR (2004) Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. *Revista Brasileira de Botânica* 27:429-437
- Barbosa WM, Otoni, WC, Carnelossi M, Silva E, Azevedo AA, Vieira G (2001) Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. *International Journal of Horticultural Science* 7:47-51
- Becerra DC, Forero AP, Góngora GA (2004) Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79:87-90
- Biasi LA, Falco MC, Rodriguez APM, Mendes BMJ (2000) Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agricola* 57:661-665
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh EIS, Otoni, WC (2009) Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:199-208
- Dornelas MC, Vieira, MLC (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:211-217
- Drew RA (1991) *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26:23-27
- Faria JLC, Segura J (1997) Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. *HortScience* 32:1276-1277
- Fernando JA, Vieira MLC, Machado SR, Appezzato-da-Gloria B (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91:37-44
- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:39-46

- Hall RM, Drew RA, Higgins CM, Dietzgen RG (2000) Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. *Australian Journal of Botany* 48:673-680
- IBGE (2006) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Culturas temporárias e permanentes. *Produção Agrícola Municipal*
- Isutsa DK (2004) Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Scientia Horticulturae* 99:395-400
- Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 80-108
- Kantharajah AS, Dodd WA (1990) *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). *Annals of Botany* 65:337-339
- Lenis •Manzano SJ, Araujo ACG, Valle CB, Santana EF, Carneiro VTC (2010) Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:435-441
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239-247
- Oliveira JC, Ruggiero C (2005) Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 142-158
- Otahola V (2000) Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Bioagro* 12:71-74
- Paim Pinto DL, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103:71-79
- Peres LEP (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento* 25:44-48
- Pipino L, Braglia L, Giovannini A, Fascella G, Mercuri A (2008) *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. *Propagation of Ornamental Plants* 8:47-49
- Pinto AP, Monteiro-Hara ACBA, Stipp LCL, Mendes BM J (2010) *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 46:28-33

- Reis LB, Paiva Neto VB, Picoli EAT, Costa MGC, Rêgo MM, Carvalho CR, Finger FL, Otoni WC (2003) Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant* 39:618-622
- Silva CV (2009) Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 82p.
- Silva ML, Paim Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:47-54
- Trevisan F, Mendes BMJ (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola* 62:346-350
- Trevisan F, Mendes BMJ, Maciel SC, Vieira MLC, Meleti LMM, Rezende JAM (2006) Resistance to *Passion fruit* woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. *Plant Disease* 90:1026-1030.
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passionflowers of the world*. Timber Press, Cambridge.
- Vieira MLC, Carneiro MS (2004) *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI, Oxford, pp 435-453
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100:49-58
- Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Passionfruit. In: Kole C, Hall TC (eds) *A compendium of transgenic crop plants*, v.5, Tropical and subtropical fruit and nuts, 1st edn. Wiley, Berlin, pp 213-23

CAPÍTULO 1

Alterações citológicas em cotilédones de *Passiflora cincinnata* Masters (Passifloraceae) durante o processo de embriogênese somática

Resumo – A caracterização das alterações celulares que ocorrem durante a embriogênese somática é essencial para compreensão dos fatores envolvidos na transição de células somáticas para competentes embriogenicamente e na determinação das células e/ou tecidos envolvidos. O presente estudo teve como objetivo descrever os eventos anatômicos e ultraestruturais que levaram a formação de embriões somáticos em *Passiflora cincinnata*. Embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio de indução MS suplementado com 18,1 μM de 2,4-D e 4,4 μM de BA. Explantes cotiledonares, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados e submetidos a técnicas convencionais de microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão. Testes histoquímicos também foram aplicados para acompanhar a mobilização de reservas durante o desenvolvimento embriogênico. A diferenciação dos embriões somáticos iniciou-se na face abaxial da região cotiledonar. Protuberâncias se formaram a partir da proliferação meristemática de células da protoderme e do meristema fundamental. Essas células apresentaram núcleos volumosos, citoplasma denso com predominância de mitocôndrias e poucos compostos de reserva. Células adjacentes ao meristema fundamental, não envolvidas na formação dessas estruturas, apresentaram-se em processo de vacuolização e acúmulo de reservas. As protuberâncias se estenderam por toda face abaxial dos cotilédones. A contínua desdiferenciação de células periféricas dessas estruturas levou à formação de zonas pró-embriogênicas que, por sua vez, se diferenciaram em embriões somáticos via padrão de origem multicelular. Nos estádios iniciais do processo embriogênico, as células não embriogênicas apresentaram grãos de amido e menos lipídeos e proteínas de reserva em relação ao explante inicial. Esses resultados fornecem informações detalhadas das modificações anatômicas e ultraestruturais envolvidas na aquisição de competência embriogênica e na diferenciação de embriões somáticos, inexistente até o momento, em *Passiflora*.

Palavras-chave: Maracujá, *Passiflora*, embriogênese somática, morfogênese, ultraestrutura, mobilização de reservas

Cytological changes in cotyledons of *Passiflora cincinnata* Masters (Passifloraceae) during somatic embryogenesis

Abstract - This study aimed to describe anatomical and ultrastructural events leading to the formation of somatic embryos in *Passiflora cincinnata*. Mature zygotic embryos were placed on MS induction medium supplemented with 18.1 μM 2,4-D and 4.4 μM BA. Cotyledons at different developmental stages were collected and subjected to conventional techniques in light, scanning electron and transmission microscopy. Histochemical tests were also performed to investigate the mobilization of reserves during the embryogenic development. Differentiation of somatic embryos initiated on the abaxial surface of cotyledons. Protuberances formed from the meristematic proliferation of cells of the protoderm and ground meristem of cotyledons. These cells had large nuclei, dense cytoplasm with predominance of mitochondria and a few reserve compounds. Cells adjacent to the ground meristem, which were not involved in the formation of these structures, were in the process of vacuolization and reserve accumulation. The protuberances were extended throughout the abaxial surface of the cotyledons. The ongoing de-differentiation of peripheral cells of these structures led to the formation pro-embryogenic zones, which in turn differentiated into somatic embryos of multicellular origin. In the initial stages of embryogenesis, the non-embryogenic cells showed starch grains and less lipids and protein reserves than the starting explant. These results provide detailed information on anatomical and ultrastructural changes involved in the acquisition of embryogenic competence and embryo differentiation that has been lacking so far in *Passiflora*.

Key words: Passion fruit, *Passiflora*, somatic embryogenesis, morphogenesis, ultrastructure, reserve mobilization

Introdução

O Brasil é o centro de diversidade da família Passifloraceae com mais de 150 espécies nativas. Dentre essas, algumas espécies silvestres de *Passiflora*, não cultivadas comercialmente, tem chamado atenção por apresentarem características de interesse potenciais para programas de melhoramento, em termos de rendimento, qualidade dos frutos e resistência a pragas e doenças (Junqueira et al. 2005; Vieira e Carneiro 2004; Zerbini et al. 2008). Dessa forma, sistemas de propagação e regeneração *in vitro* tem sido desenvolvidos a fim de possibilitar o suprimento constante e homogêneo de material vegetal para a utilização dessas espécies em procedimentos de transformação genética (Dornelas e Vieira 1994; Mohamed 1996; Antony et al. 1999; Lombardi et al. 2007; Reis et al. 2007; Silva et al. 2009).

Passiflora cincinnata Masters destaca-se, nesse contexto, por apresentar plantas rústicas, vigorosas, tolerantes a nematoides (*Meloidogyne* sp.) e a bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) (Oliveira e Ruggiero 2005). Essa espécie apresenta boa performance *in vitro*, mostrando elevada frequência de formação de gemas (Vieira e Carneiro 2004; Lombardi et al. 2007; Zerbini et al. 2008). Além disso, é uma das poucas espécies do gênero em que o processo de embriogênese somática foi descrito (Reis et al. 2007; Silva et al. 2009), representando assim, uma espécie modelo para prossecução e adequação de estudos morfogênicos no gênero (Dias et al. 2009).

A embriogênese somática possui papel de destaque, entre as técnicas de cultura de tecidos, uma vez que se apresenta como um sistema eficiente para a regeneração de plantas em larga escala bem como para a compreensão dos aspectos morfofisiológicos e moleculares envolvidos na diferenciação celular (Fehér et al. 2003; Kurczynska et al. 2007).

O entendimento de mecanismos básicos da transição de células somáticas para competentes embriogenicamente e a determinação da origem celular e/ou grupos de células envolvidas na regeneração é essencial, tanto para o desenvolvimento de protocolos eficientes (Fehér et al. 2003; Fehér, 2005; Perez-Núñez et al. 2006) quanto para a validação do uso da embriogênese somática em programas de transformação genética (Shang et al. 2009).

Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de embriogênese somática tem fornecido descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e histodiferenciação de embriões somáticos (Canhoto et al. 1996; Nonohay et al. 1999; Puigderrajols et al. 2000, 2001; Corredoira et al. 2006; Moura et al. 2008; 2010; Solís-Ramos et al. 2010). Além disso, métodos histoquímicos tem permitido o monitoramento da mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico,

possibilitando reconhecer regiões e/ou tecidos que requerem alta demanda energética (Branca et al. 1994; Cangahuala-Inocente et al. 2004, 2009).

Em *Passiflora*, estudos dessa natureza foram realizados envolvendo a organogênese *in vitro* (Appezato-da-Glória et al. 1999; Fernando et al. 2007; Lombardi et al. 2007). Contudo, a despeito da importância dessas análises na caracterização da embriogênese somática, em espécies do gênero, pouco tem sido relatado.

O presente trabalho descreve as alterações histocitológicas e do acúmulo de reservas envolvidos no processo de embriogênese somática de *Passiflora cincinnata* obtido a partir de embriões zigóticos maduros.

Material e métodos

Indução de embriogênese somática

As culturas embriogênicas foram obtidas a partir embriões zigóticos maduros de *Passiflora cincinnata* Masters (Passifloraceae), conforme descrito por Silva et al. (2009). As sementes foram coletadas de frutos de plantas mantidas sob polinização aberta, no pomar do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20° 45' S e 42° 51' O).

As sementes tiveram os tegumentos removidos e, em seguida, foram desinfestadas e imersas em água deionizada e autoclavada por uma noite. Os embriões zigóticos foram excisados e colocados em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo meio de indução de embriogênese somática, constituído por sais básicos MS (Murashige e Skoog 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968), 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, 18,1 µM de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), 4,5 µM de 6-benzilaminopurina (BA) e 0,28% (p/v) de agente gelificante (Phytigel, Sigma Chemical Company, USA), pH 5,7. Foram colocados 5 embriões por placa, totalizando 40 placas. Essas foram vedadas com adesivo acrílico (Nexcare Micropore 3M, Brasil) e mantidas, no escuro, em estufa incubadora (Forma Scientific, USA), sob temperatura de 27 ± 2 °C durante 30 dias.

Após esse período, os explantes obtidos foram transferidos para o meio de maturação dos embriões somáticos, contendo a mesma constituição básica do meio de indução, porém desprovido de reguladores de crescimento e suplementado com 1,5% (p/v) de carvão ativado. O meio foi vertido em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal 90 x 15 mm (J. Prolab, Brasil), vedadas com filme plástico transparente PVC (Goodyear, Brasil). Nessa fase, as

placas foram acondicionadas em sala de cultura sob temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram luz do dia, Brasil).

Preparação das amostras para análises microscópicas

Para caracterização anatômica e ultraestrutural do processo de embriogênese somática, explantes de embriões zigóticos de *P. cincinnata* foram coletados diariamente até o sexto dia de cultura e a cada dois dias após a indução da embriogênese somática, mesmo após a transferência dos explantes para o meio de maturação. As amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5mM] (Karnovsky, 1965) modificado.

Microscopia de luz e caracterização histoquímica

Para os estudos anatômicos, amostras fixadas aos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 22, 26 e 32 dias após indução foram desidratadas em série de concentração crescente de etanol e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais e longitudinais com 5 μm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e coradas com azul de toluidina (pH 3,2) (O'Brien e McCully 1981) para caracterização estrutural; xylidine Ponceau (Vidal 1977) para detecção de proteínas totais e ácido periódico–reagente de Schiff (PAS; Feder e O'Brien 1968) para polissacarídeos totais. Sudan vermelho (Pearse 1980) e vermelho neutro (Kirk 1970) para detecção de lipídeos foram aplicados em amostras apenas fixadas. Secções submetidas ao vermelho neutro foram examinadas em luz UV com filtro de excitação azul (BP 450-490nm). A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz e fluorescência (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), no laboratório de Anatomia Vegetal de UFV.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas aos 0, 8, 18, 26 e 30 dias após indução foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, secas ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha) e metalizadas com ouro (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra), do Núcleo de apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise ultraestrutural, amostras fixadas aos 0, 1, 4, 12 e 22 dias após indução foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,05 M, desidratadas em série de concentração crescente de acetona, infiltradas e polimerizadas em resina epóxica de baixa viscosidade Spurr (Spurr 1969). Secções com 70 nm de espessura foram obtidas em ultramicrotomo (Leica UC6, Leica Microsystems Inc., USA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, em 50 kV, com câmera digital acoplada (EM900, Zeiss, Alemanha) do NAP/MEPA.

Resultados

Desenvolvimento dos embriões somáticos

O padrão de embriogênese primária obtido a partir de embriões zigóticos maduros de *P. cincinnata* iniciou-se preferencialmente na face abaxial da região cotiledonar.

Os cotilédones são constituídos por uma superfície lisa, com contorno nítido das paredes anticlinais na face abaxial (Fig. 1A). Em secção longitudinal, apresentam protoderme unisseriada, com células retangulares, mesófilo indiferenciado com várias camadas de células de formato cuboide e pequenos espaços intercelulares (Fig. 2A).

Após 4 dias em meio de indução de embriogênese somática, embriões zigóticos apresentaram intumescimento uniforme. Nesse estágio, foram observadas células da protoderme com formato isodiamétrico e divisões periclinais nas células do meristema

fundamental (Fig. 2B). Em ambos os tecidos, as células continham núcleos volumosos e nucléolos conspícuos, características não observadas no explante inicial (Fig. 2A).

Após 6 dias em meio de indução, divisões celulares no sentido anticlinal e em orientações aleatórias foram visualizadas na protoderme e no meristema fundamental, respectivamente (Fig. 2C). Células da protoderme, após sucessivas divisões anticlinais, se expandiram num processo contínuo e assumiram formato colunar (Fig. 2D). Essas células possuem citoplasma denso, núcleos volumosos e nucléolos evidentes. Divisões periclinais também foram observadas nesse tecido, caracterizando o início de formação das protuberâncias (Figs. 1B, 2D).

As características meristemáticas observadas nas células protodérmicas foram estendidas as derivadas imediatas do meristema fundamental que se dividiram em diversos planos, contribuindo ativamente para a formação das protuberâncias (Fig. 2E). Após 18 dias de cultivo, o desenvolvimento das protuberâncias recém-formadas e a proliferação para áreas vizinhas resultaram na cobertura da face abaxial dos cotilédones (Figs. 1C, 2F).

Nas protuberâncias, o nível de vacuolização aumentou gradualmente a partir das células das camadas periféricas para as camadas internas do explante. Tecidos vasculares entremeando a estrutura foram observados (Figs. 2F, G). A contínua desdiferenciação das células periféricas das protuberâncias levou a formação de zonas pró-embriogênicas (Fig. 2H, 3A). Essas regiões eram constituídas por grupos de células individualizadas com citoplasma denso e alta relação núcleo/citoplasma. Em alguns casos, o desenvolvimento das zonas pró-embriogênicas e a exposição de estruturas embriogênicas acarretaram no rompimento das camadas periféricas das protuberâncias (Figs. 1D, 3D).

A desdiferenciação das zonas pró-embriogênicas em embriões somáticos foi gradual, porém assíncrono (Fig. 1E). Após a transferência dos explantes para o meio de maturação, embriões somáticos nos estádios: globular (Figs. 1F, 3B); cordiforme (Figs. 1G, H, 3C); torpedo (Figs. 1I, 3E) e cotiledonar (Fig. 1J) foram visualizados na superfície do explante. Alguns embriões apresentaram-se conectados ao tecido do explante por estruturas similares a suspensores (Fig. 1G).

Protoderme, meristema fundamental e procâmbio foram identificados nos embriões somáticos (Figs. 3B-E), embora o procâmbio tenha sido observado neste estudo, nos estádios de torpedo e cotiledonar (Fig. 3E).

Caracterização histoquímica

Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células da protoderme e do meristema fundamental dos cotilédones. Corpos proteicos foram evidenciados pela reação positiva ao xylidine Pounceau (Fig. 4A), que apresentaram formato arredondado e tamanho variados. A presença de lipídeos foi confirmada pela reação positiva ao sudan vermelho e vermelho neutro (Figs. 4B, C, respectivamente) armazenados na forma de corpos lipídicos (Fig. 5). Não foram identificados grãos de amido nos cotilédones (Fig. 4D).

Após 6 dias em meio de indução de embriogênese somática, células cotiledonares não reagiram ao xylidine Pounceau (Fig. 4E). Corpos lipídicos também foram menos abundantes quando comparados ao estágio inicial e localizavam-se na região periférica da célula, próximo à parede celular (Fig. 4F, G). Grãos de amido ocorreram distribuídos uniformemente na protoderme e no meristema fundamental (Fig. 4H).

O decréscimo na quantidade de corpos lipídicos foi gradual durante o processo de embriogênese somática até a sua completa escassez. Após 18 dias, no estágio de calo embriogênico, somente grãos de amido foram detectados nas camadas periféricas das protuberâncias (Figs. 4I-L), embora pequenas inclusões coradas com xylidine Pounceau tenham sido observadas (Fig. 4I).

Nos embriões somáticos, materiais de reserva como lipídeos e proteínas não foram observados, apenas grãos de amido foram identificados, porém não eram abundantes ou uniformemente distribuídos por todas as células.

Aspectos ultraestruturais

Antes da indução, células da protoderme e do meristema fundamental dos cotilédones apresentaram protoplasma completamente preenchido por grandes corpos proteicos e corpos lipídicos não-coalescidos (Fig. 5A). Os corpos proteicos eram formados por uma matriz homogênea, elétron-densa, com inclusões do tipo globoide no interior. As demais regiões do citoplasma estavam preenchidas com numerosos corpos lipídicos de formato irregular. Um dia após a indução, as características celulares apresentaram-se praticamente inalterados, contudo, corpos proteicos apresentaram invaginações na superfície e inclusões elétron-transparentes foram identificadas no interior dessas estruturas (Fig. 5B).

Após 4 dias de cultivo, corpos proteicos não foram observados. Corpos lipídicos apresentaram-se menores e, aparentemente, em menor quantidade. Adquiriram formato

arredondado e tornaram-se mais elétron-densos (Figs. 5C, D). Cordões citoplasmáticos puderam ser observados entre os corpos lipídicos que, por sua vez, encontravam-se distribuídos por toda célula. No citoplasma, mitocôndrias e amiloplastos estavam presentes (Fig. 5D).

Nos estádios iniciais de formação das protuberâncias, intensa atividade mitótica foi observada nas camadas periféricas dos cotilédones (Fig. 5E). Células da protoderme apresentaram citoplasma denso, núcleo esférico e nucléolo proeminente (Figs. 5E, F). Os vacúolos eram pouco desenvolvidos e a maioria possuía pequeno tamanho. As mitocôndrias eram numerosas e apresentaram matriz densa e cristas desenvolvidas. Amiloplastos com pequeno acúmulo de grãos de amido também foram observados. Corpos lipídicos encontravam-se espalhados por todo citoplasma, porém, em pequenas quantidades e tamanho reduzido (Fig. 5F).

Células do meristema fundamental apresentaram-se em processo de vacuolização (Fig. 5E). Corpos lipídicos eram mais evidentes que os das células da protoderme e se localizavam próximos à parede celular. Glioxissomos foram observados adjacentes aos corpos lipídicos (Figs. 5G, H). Essas organelas são elétron-densas e apresentam formatos variados. Acúmulo de grãos de amido foi evidenciado nos amiloplastos que apresentaram estroma denso (Fig. 5H). Populações de mitocôndrias foram menores aos das células da protoderme.

Nas zonas pró-embriogênicas formadas nas camadas periféricas das protuberâncias, as células possuíam citoplasma denso contendo, predominantemente, ribossomos livres, dictiossomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e alguns amiloplastos (Figs. 5I-K). Os dictiossomos encontravam-se distribuídos aleatoriamente no citoplasma. Eram constituídos por poucas cisternas cada e apresentaram-se ativos na produção de vesículas (Figs. 5J, K). As mitocôndrias eram predominantemente globosas e mostraram cristas proeminentes (Figs. 5J, K). O retículo endoplasmático apresentou-se desenvolvido, frequentemente disposto em série paralela e distribuído por todo citoplasma (Fig. 5I). Nessas células, o componente vacuolar era reduzido e reservas de lipídeos e proteínas estavam ausentes.

Discussão

Alterações estruturais durante a embriogênese somática

Em *Passiflora cincinnata*, a cultura de embriões zigóticos maduros em meio de indução e maturação, promoveu a formação de embriões somáticos (Silva et al. 2009).

Entretanto, avaliações citológicas dos eventos que conduzem o processo de embriogênese a partir do tecido dos explantes não tinham sido realizadas até o momento. A presente análise indicou que o potencial embriogênico dos explantes ocorreu predominantemente na face abaxial dos cotilédones. Observações semelhantes foram relatadas por Santarém et al. (1997) ao avaliar os efeitos da orientação dos explantes cotiledonares de *Glycine max* na frequência de indução de embriogênese somática.

A aquisição de competência embriogênica tem sido atribuída às células que durante a fase de indução adquirem caracteres meristemáticos (Fehér 2005). É interessante notar que a proliferação meristemática de células da protoderme e meristema fundamental observada durante a diferenciação nos explantes cotiledonares de *P. cincinnata* não originou embriões somáticos ou estruturas embriogênicas, mas sim protuberâncias constituídas por células parenquimáticas e tecido vascular. Esses resultados, assim como sugerido por San-José et al. (2010), colocam em questão se células que adquirem características meristemáticas podem ser denominadas competentes embriogênicas, em sistemas como ao de *P. cincinnata*, embora para que essas respostas ocorram, necessitem de estímulos externos. Contudo, após a formação das protuberâncias, respostas embriogênicas foram obtidas, sendo possível que o desenvolvimento dessas esteja associado à fase de redeterminação de células embriogênicas, como proposto por outros autores em outras espécies vegetais (Barciela e Vieitez 1993; Quiroz-Figueroa et al. 2002; Fehér 2005).

A formação de protuberâncias nos estádios que precedem o desenvolvimento dos embriões somáticos sugere que essas estruturas constituam a fase de calo desse sistema. Porém, a organização histológica observada durante o desenvolvimento das protuberâncias e a incapacidade de se proliferarem indefinidamente como calos propriamente ditos, não suportam essa hipótese, sendo esse um objeto de discussão. Duhem et al. (1989), trabalhando com *Theobroma cacao* encontraram resposta semelhante ao observado em *P. cincinnata* e propuseram que este sistema seria um processo intermediário entre embriogênese direta e indireta. Em *Quercus suber*, Puigderrajols et al. (2001) sugeriram que o desenvolvimento embriogênico tenha ocorrido diretamente, embora a formação de massas compactas antes da diferenciação dos embriões somáticos tenha sido observada.

A desdiferenciação de células periféricas das protuberâncias e sua rediferenciação em pequenos grupos de células individualizadas (zonas pró-embriogênicas) indicam que os embriões somáticos de *P. cincinnata* tenham se originado via padrão multicelular. Contudo, embriões com estruturas similares a suspensores, típico de embriões de origem unicelular (Queiróz-Figueroa et al. 2006) foram observados em MEV. A ocorrência de ambos os padrões de formação no mesmo sistema embriogênico tem sido relatada em diferentes espécies

(Dussert et al. 1995, Puigderrajols et al. 2001, Moura et al. 2008, San-José et al. 2010). Mesmo em sistemas em que a embriogênese tenha ocorrido via de origem multicelular, a presença de proembriões de origem unicelular foi observada, embora esses embriões tenham se degenerado (Alemanno et al. 1996). Novas análises histológicas serão necessárias para confirmar a ocorrência de proembriões de origem unicelular em *P. cincinnata*, uma vez que essas estruturas não foram identificadas no presente estudo.

Uma vez que a origem dos embriões somáticos envolve a proliferação e a desdiferenciação de células do explante, o risco de variação somaclonal não pode ser negligenciado. Contudo, além das análises anatômicas do presente estudo não terem evidenciado a presença de uma fase verdadeira de calo, a estabilidade no nível de ploidia de plantas de *P. cincinnata* regeneradas mediante embriogênese primária e secundária, foi confirmada, em estudo anterior, por análises de citometria de fluxo (Paim Pinto et al. 2010).

Aspectos ultraestruturais e mobilização de reservas

As características citológicas observadas nas células cotiledonares dos explantes iniciais como acúmulo de reservas, poucas organelas e sistema de membrana inativo podem ser interpretadas como sinais de baixa atividade metabólica, além de ressaltarem a função de armazenamento dos cotilédones, como verificado em outras espécies (Canhoto et al. 1996; Moura et al. 2010; Zienkiewicz et al. 2011).

Reservas são cruciais para os eventos morfogênicos *in vitro* e diversos estudos tem correlacionado a dinâmica de mobilização desses compostos com o padrão de desenvolvimento organogênico ou de embriogênese somática (Branca et al. 1994; Canhoto et al. 1996; Martin et al. 2000; Cangahuala-Inocente et al. 2004, 2009; Pinto et al. 2010). A natureza dos compostos de reservas é basicamente carboidratos, lipídeos e proteínas, sendo que a proporção desses compostos é específica para cada espécie. Em monocotiledôneas, carboidratos e proteínas prevalecem como principais produtos de reserva, enquanto que as dicotiledôneas armazenam principalmente lipídeos e proteínas (Bewley e Black 1994). De fato, nos cotilédones de embriões zigóticos de *P. cincinnata*, somente lipídeos e proteínas foram identificados como fontes iniciais de reserva, corroborando com o padrão comum descrito para espécies de dicotiledôneas.

Durante os estádios iniciais da fase de indução, a menor quantidade dos compostos armazenados não coincidiu com as alterações estruturais descritas no mesmo período. Proteínas e lipídeos foram total e parcialmente consumidos, respectivamente, antes mesmo do início de formação das protuberâncias, quando as células da protoderme adquiriram

características meristemáticas. Contudo, evidentes alterações citológicas foram descritas nesse estágio inicial, suportando a idéia de que componentes de reserva são necessários para reorganização e diferenciação celular (Zienkiewicz et al. 2011). Fosfolipídeos liberados a partir da mobilização de corpos lipídicos poderiam ser utilizados como substratos para a rápida síntese dos diferentes tipos de sistemas de membrana e organelas, presentes em células diferenciadas (Murphy 2001).

Os mecanismos celulares de mobilização de corpos lipídicos envolvem a participação de glioxissomos (Graham 2008). De fato, a proximidade entre essas organelas foram registradas em células do meristema fundamental dos cotilédones de *P. cinnamomum*. Os glioxissomos apresentam lipases (Bewley e Black 1994) necessárias para o ciclo de β -oxidação lipídica. Contudo, a forma como ocorre o transporte de lipídeos dos corpos lipídicos para os glioxissomos permanece desconhecida (Zienkiewicz et al. 2011).

Corpos proteicos foram rapidamente consumidos durante o processo embriogênico, podendo esse evento estar relacionado à existência prévia de proteases. Na literatura é geralmente aceito que endo e exopeptidases inativas já estejam presentes em corpos proteicos de sementes secas (Bewley e Black 1994; Müntz 1998; Buckeridge et al. 2004). Após embebição, essas enzimas tornariam ativas iniciando a hidrólise das proteínas de reserva (Bewley e Black 1994; Müntz 1998). As intensas invaginações na superfície de corpos proteicos e aumento de tamanho de inclusões elétron-transparentes no seu interior, observado após um dia em meio de indução, sugerem que endo e exopeptidases atuaram concomitantemente em direção a mobilização desses compostos.

As características ultraestruturais das células da protoderme observadas no início da formação das protuberâncias como citoplasma denso, ocorrência abundante de mitocôndrias, núcleos proeminentes e pequenas quantidades de compostos de reserva, são similares às descritas para células com competência embriogênica (Queiroz-Figueroa et al. 2006). A abundância de mitocôndrias e a baixa quantidade de amido e corpos lipídicos evidenciam a alta demanda energética para a formação das protuberâncias. Nessas células, os grãos de amido são fontes primárias de energia, sendo rapidamente mobilizados para a contínua proliferação celular (Rodrigues e Wetzstein 1998; Cangahuala-Inocente et al. 2004).

Grãos de amido foram observados nos estádios iniciais da diferenciação dos embriões zigóticos, em células não embriogênicas, substituindo aparentemente, a reserva de lipídeos e proteínas do explante. Embriões zigóticos de *P. cinnamomum* não apresentaram esse composto como material de reserva indicando a ocorrência de síntese *de novo*. Elevada quantidade de amido foi observada durante a formação de embriões somáticos em diferentes espécies (Rodriguez e Wetzstein 1998; Verdeil et al. 2001; Queiroz-Figueroa et al. 2002; Moura et al.

2008; Pinto et al. 2010). Entretanto, a possível função desse composto nos processos de embriogênese somática ainda não foi esclarecida. A síntese de amido pode estar diretamente associada à mobilização do conteúdo lipídico, via ciclo do glioxilato, uma vez que grãos de amido foram detectados no mesmo estágio em que foi evidenciada a redução de lipídeos. Nossos registros da ocorrência de glioxissomos próximos a corpos lipídicos corroboram com essa hipótese. Contudo, alguns autores atribuem a formação de amido em sistemas de embriogênese *in vitro* à presença de sacarose no meio de cultura (Pinto et al. 2010). Elevados níveis desse açúcar no citosol estimulam a síntese desse composto (Buckeridge et al. 2004).

Zonas pró-embriogênicas possuem características ultraestruturais similares aos das células da protoderme no início da formação das protuberâncias. Porém, a grande população de dictiosomos, ativos na produção de vesículas, foi evidente nesse grupo de células. Em meristemoides de *Glycine max*, o aumento do número de dictiosomos, tipicamente envolvidos na liberação de materiais no apoplasto, foi associado à síntese de componentes da parede celular (Appenzato-da-Glória e Machado 2004), sendo da mesma forma interpretado para *P. cinnamomata*.

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações anatômicas e ultraestruturais detalhadas do processo de embriogênese somática em *Passiflora*. Estes dados podem auxiliar as pesquisas sobre os fatores envolvidos na transição embriogênica, bem como, subsidiar investigações, em curso, da dinâmica de expressão de genes, durante os diferentes estágios de desenvolvimento, envolvidos no processo embriogênico.

Agradecimentos

À equipe técnica do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (ESALQ/USP) pelo auxílio na preparação das amostras e uso dos microscópios e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

Alemanno L, Berthouly M, Michaux-Ferrière N (1996) Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 46:187-194. doi: 10.1007/BF02307094

- Anthony P, Otoni WC, Power JB, Lowe KC, Davey MR (1999) Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: Hall RD (ed) *Plant cell culture protocols*, 1st edn. Humana Press, Wageningen, pp 169-181
- Appezzato-da-Glória, B, Vieira MLC, Dornelas MC (1999) Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:2007-2013. doi: 10.1590/S0100-204X1999001100005
- Appezzato-da-Glória B, Machado SR (2004) Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. *Revista Brasileira de Botânica* 27:429-437. doi: 10.1590/S0100-84042004000300004
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum, London
- Barciela J, Vieitez AM (1993) Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. *Annals of Botany* 71:395-404. doi: 10.1006/anbo.1993.1050
- Branca C, Torelli A, Fermi P, Altamura MM, Bassi M (1994) Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. *Protoplasma* 182:59-64. doi: 10.1007/BF01403689
- Buckeridge MS, Aidar MPM, Santos HP, Tiné MAS (2004) Acúmulo de reservas. In: Ferreira AG, Borghetti F. (eds.) *Germinação: do básico ao aplicado*, 1st edn. ARTMED, Porto Alegre, pp 31-50
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004) Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33-40. doi: 10.1007/s00709-004-0055-5
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:217-224. doi: 10.1590/S0100-204X2009000300001
- Canhoto JM, Mesquita JF, Cruz GS (1996) Ultrastructural changes in cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 78:513-521. doi: 10.1006/anbo.1996.0149
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez, AM (2006) Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 42:525-533. doi: 10.1079/IVP2006827
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh EIS, Otoni, WC (2009) Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion

- fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 99:199-208. doi: 10.1007/s11240-009-9594-y
- Dornelas MC, Vieira, MLC (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 36:211-217. doi: 10.1007/BF00037722
- Duhem K, Le Mercier N, Boxus P (1989) Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao* L. *Cafe Cacao Thé* 33:9-14.
- Dussert S, Verdeil JL, Rival A, Noirot M, Buffard-Morel J (1995) Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. *Plant Science* 106:185-193. doi: 10.1016/0168-9452(95)04079-A
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55:123-142
- Fehér A, Pasternak T, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 74:201-228. doi: 10.1023/A:1024072913021
- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib A, Samaj J (eds) *Somatic embryogenesis*, 1st edn. Springer Verlag, Berlin, pp 85-101. doi: 10.1007/7089_019
- Fernando JA, Vieira MLC, Machado SR, Appezzato-da-Gloria B (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 91:37-44. doi: 10.1007/s11240-007-9275-7
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology* 59:115-142. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938
- Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*, 1st edn. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 80-108
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138
- Kurczynska EU, Gaj MD, Ujczak A, Mazur E (2007) Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 226:619-628. doi: 10.1007/s00425-007-0510-6

- Kirk PW Jr (1970) Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45:1-4. doi: 10.3109/10520297009063373
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezato-da-Glória B (2007) In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239-247. doi: 10.1590/S1516-89132007000200009
- Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N (2000) Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and nonembryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science* 154:143-151. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00251-4
- Mohamed ME, Hicks, RGT, Blakesley D (1996) Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 46:161-164. doi: 10.1007/BF00034851
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 95:175-184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9
- Moura EF, Ventrella, MC, Motoike, SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67:399-407. doi: 10.1590/S0103-90162010000400004
- Müntz K (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* 38:77-99. doi: 10.1023/A:1006020208380
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murphy DJ (2001) Biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research* 40:325-438. doi: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3
- Nonohay JS, Mariath, JEA, Winge, H (1999) Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. *Plant Cell Reports* 18:929-934. doi: 10.1007/s002990050686
- O'Brien TP, McCully ME (1981) *The study of plant structure principles and selected methods*. Termarcarphi Pty, Melbourne

- Oliveira JC, Ruggiero C (2005) Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*, 1st edn. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 142-158
- Paim Pinto DL, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 103:71-79 doi: 10.1007/s11240-010-9756-y
- Pearse AGE (1980) *Histochemistry theoretical and applied*, v.2, 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 42:37-43. doi: 10.1079/IVP2005722
- Pinto G, Silva S, Araújo C, Neves L, Santos C (2010) Histocytological changes and reserves accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Trees* 24:763-769. doi: 10.1007/s00468-010-0446-5
- Puigderrajols P, Celestino C, Suils M, Toribio M, Molinas M. (2000) Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. *International Journal of Plant Sciences* 161:353-362. doi: 10.1086/314266
- Puigderrajols P, Mir G, Molinas M (2001) Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany* 87:179-189. doi: 10.1006/anbo.2000.1317
- Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20:1141-1149. doi: 10.1007/s00299-002-0464-x
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 86:285-301. doi: 10.1007/s11240-006-9139-6
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Pinto DLP, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738:425-431
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208
- Rodriguez APM, Wetzstein HY (1998) A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illionensis*) somatic embryogenesis

- cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma* 204:71-83. doi: 10.1007/BF01282295
- San-José MC; Corredoira E, Martínez, MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez, AM (2010) Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Reports* 29:661-671. doi: 10.1007/s00299-010-0852-6
- Santarém ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effects of explant orientation, pH, solidifying agents and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 33:13-19. doi: 10.1007/s11627-997-0034-6
- Shang HH, Liu CL, Zhang CJ, Li FL, Hong WD, Li FG (2009) Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of Cotton. *Journal of Integrative Plant Biology* 51:456-465. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00824.x
- Silva ML, Paim Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 99:47-54. doi: 10.1007/s11240-009-9574-2
- Solís-Ramos LY, Nahuath-Dzib S, Andrade-Torres A, Barredo-Pool F, González-Estrada T, Serna EC (2010) Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia* 65:504-511. doi: 10.2478/s11756-010-0049-z
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26:31-43. doi: 10.1016/S0022-5320(69)90033-1
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Michaux-Ferriere N, Nicole M (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany* 88:9-18. doi: 10.1006/anbo.2001.1408
- Vidal BC (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cellular and Molecular Biology* 22:45-64.
- Vieira MLC, Carneiro MS (2004) *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*, 1st edn. CABI, Oxford, pp 435-453
- Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Passionfruit. In: Kole C, Hall TC (eds) *A compendium of transgenic crop plants*, v.5, Tropical and subtropical fruit and nuts, 1st edn. Wiley, Berlin, pp 213-234

Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI (2011)
Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed
germination and seedling growth. *Protoplasma*. doi: 10.1007/s00709-010-0242-

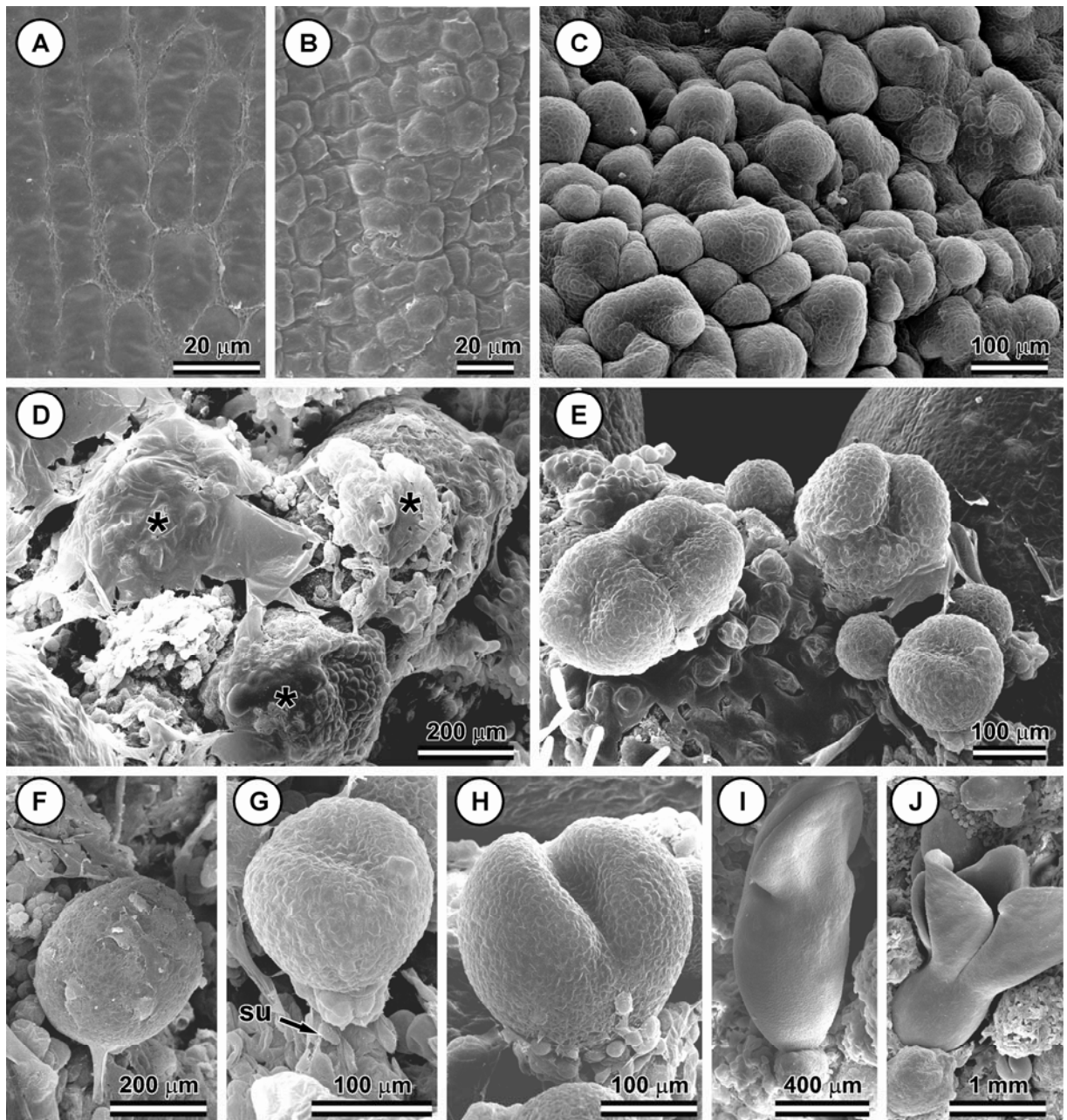


Figura 1. Superfície cotiledonar de embriões zigóticos de *Passiflora cincinnata* em diferentes estádios do processo de embriogênese somática. Micrografias eletrônicas de varredura. (A-C) Face abaxial dos cotilédones após 0, 8 e 18 dias em meio de indução, respectivamente. (B) Início do desenvolvimento das protuberâncias. (C) Proliferação das protuberâncias por toda face. (D) Rompimento das protuberâncias e exposição de estruturas embriogênicas (*). (E) Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. (F) Embrião somático no estágio globular. (G) Cordiforme precoce. Notar a presença do suspensor (su). (H) Cordiforme tardio. (I) Torpedo. (J) Cotiledonar.

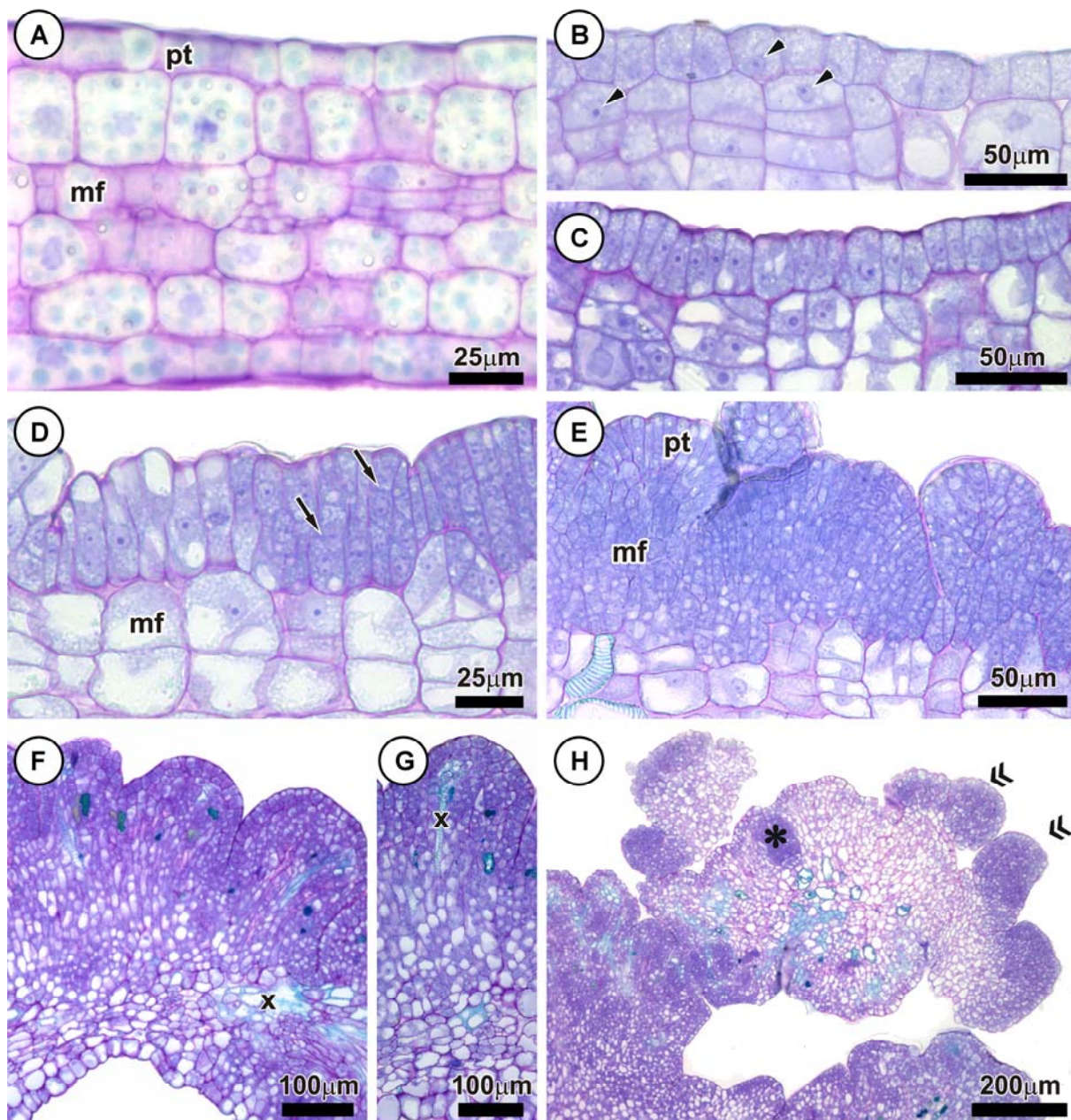


Figura 2. Sequência de eventos anatômicos do processo de embriogênese primária a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora cincinnata*. Secções longitudinais. (A) Lâmina cotiledonar do embrião zigótico utilizado como explante na indução de embriogênese somática. (B) Face abaxial do cotilédone após 4 dias em meio de indução. Células com núcleo e nucléolo evidentes (►). (C, D) Mesma região após 6 e 8 dias de cultivo, respectivamente. Diferenciação das células da protoderme. Divisões periclinais (seta preta). (E) Face abaxial dos cotilédones após 12 dias de cultivo. Proliferação meristemática das células da protoderme (pt) e do meristema fundamental (mf). (F, G) Cotilédone após 18 dias em meio de indução. Protuberâncias desenvolvidas. (H) Diferenciação de zonas pró-embriogênicas (*) e estruturas embriogênicas (>>) na periferia das protuberâncias. Abreviaturas: mf, meristema fundamental; pt, protoderme; x, xilema.

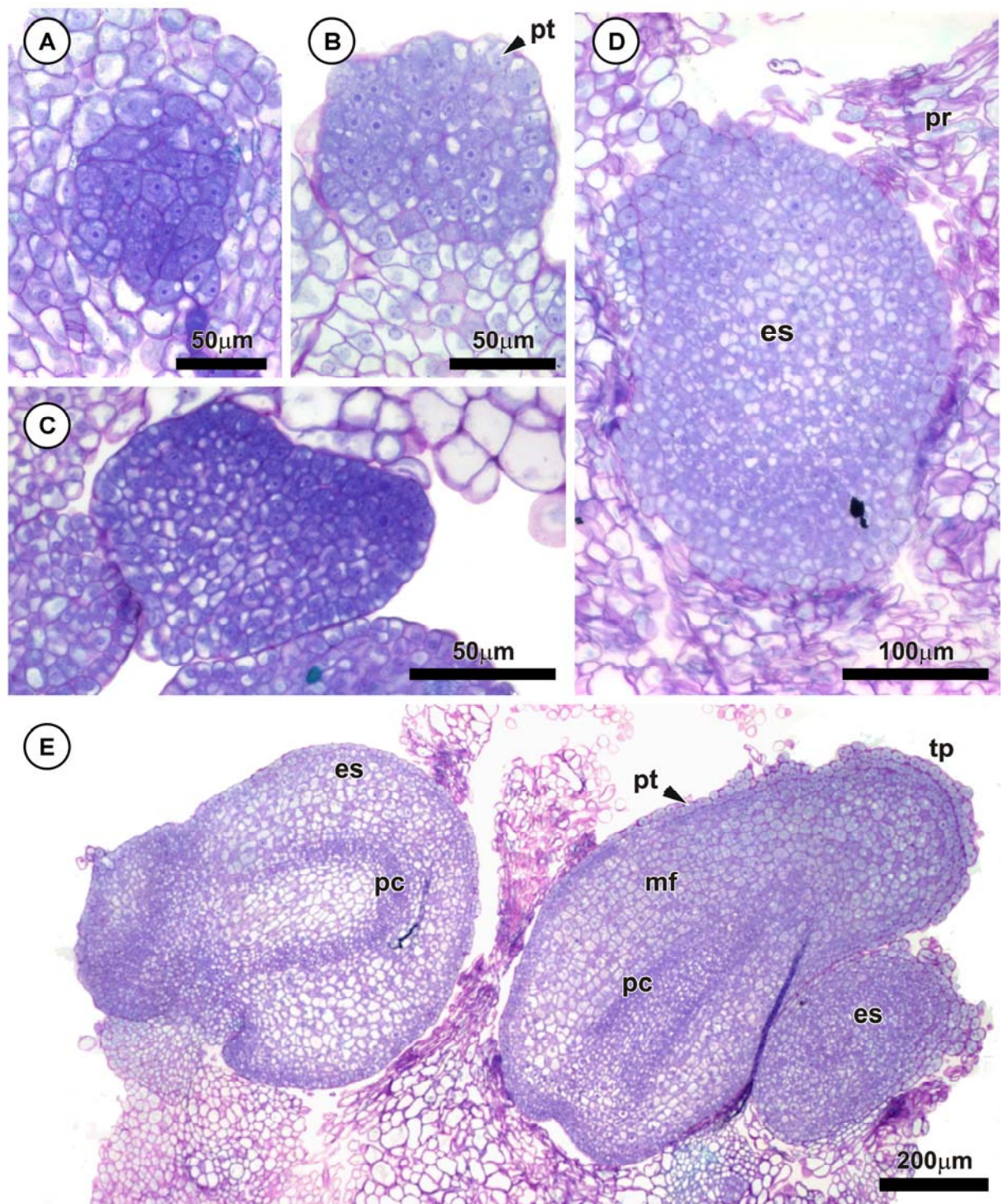


Figura 3: Embriões somáticos formado por padrão de origem multicelular. Secções longitudinais. (A) Zona pró-embriogênica formada na periferia da protuberância. (B) Embrião somático no estágio globular. Notar o início da formação da protoderme (pt). (C) Embrião cordiforme. (D) Rompimento das camadas periféricas da protuberância (pr) e exposição do embrião somático (es). (E) Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Notar a formação do procâmbio (pc). Abreviaturas: es, embrião somático; mf, meristema fundamental; pc, procâmbio; pr, protuberância; pt, protoderme; tp, torpedão.

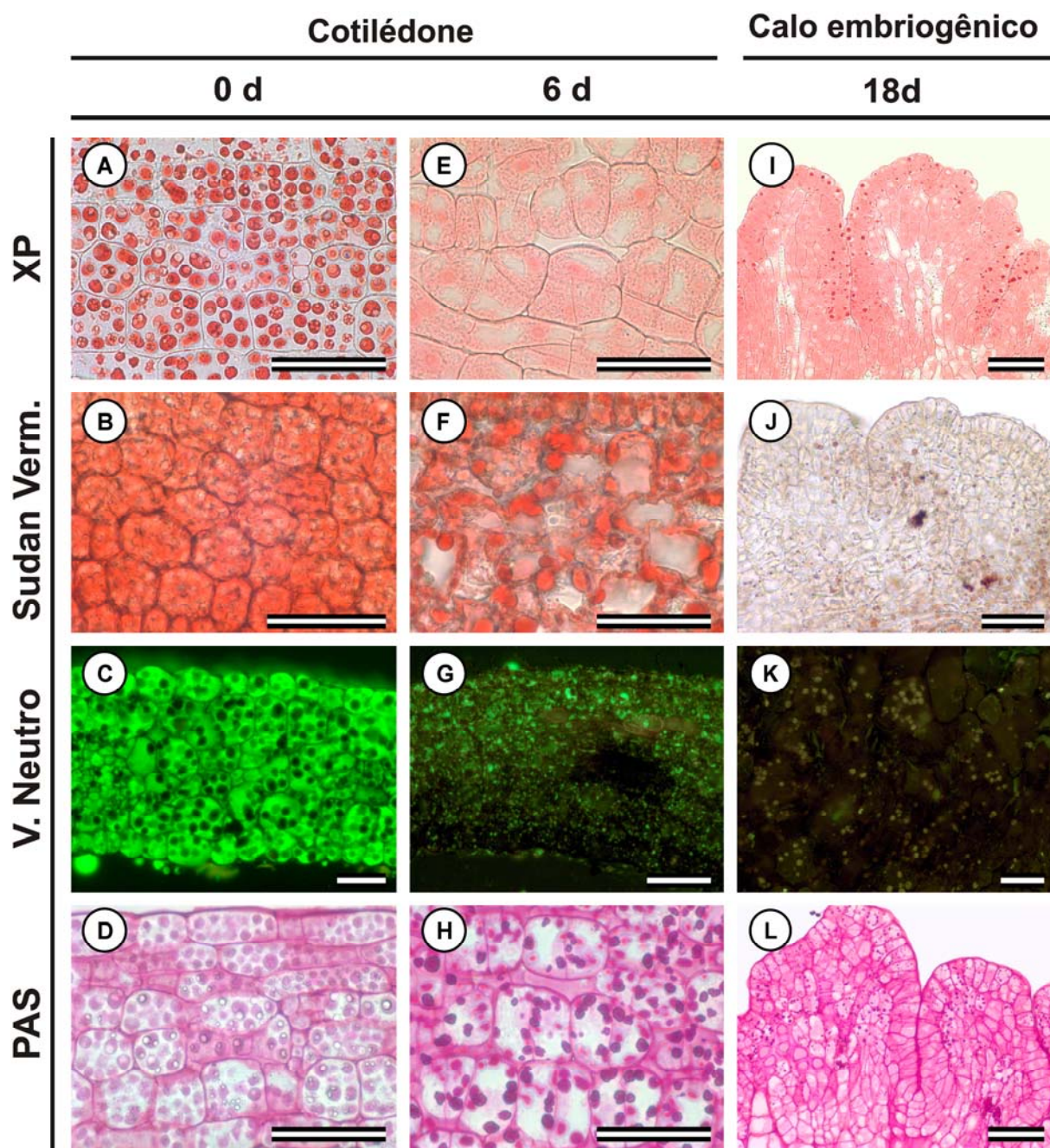


Figura 4. Cotilédones de embriões zigóticos maduros de *Passiflora cincinnata* durante o processo de embriogênese somática, em estudo histoquímico. Secções transversais submetidas ao xylidine Ponceau (A, E, I), sudan vermelho (B, F, J), vermelho neutro (C, G, K) e ao PAS (D, H, L). (A-D) Amêndoas embebidas. (A) Corpos proteicos corados positivamente de vermelho. (B, C) Reação positiva para lipídeos evidenciados pela coloração alaranjada no teste com sudan vermelho (B) e fluorescência verde com vermelho neutro (C). (D) Reação negativa para carboidratos totais. (E-H) Cotilédones após 6 dias em meio de indução. (E) Reação negativa para corpos proteicos. (F, G) Reação positiva para lipídeos. (H) Grãos de amido corados positivamente ao teste com PAS. (I-L) Explantes após 18 dias em meio de indução. (I) Reação negativa para corpos proteicos. (J, K) Reação negativa para lipídeos. (L) Grãos de amido detectados nas células periféricas das protuberâncias. Barras = 50µm.

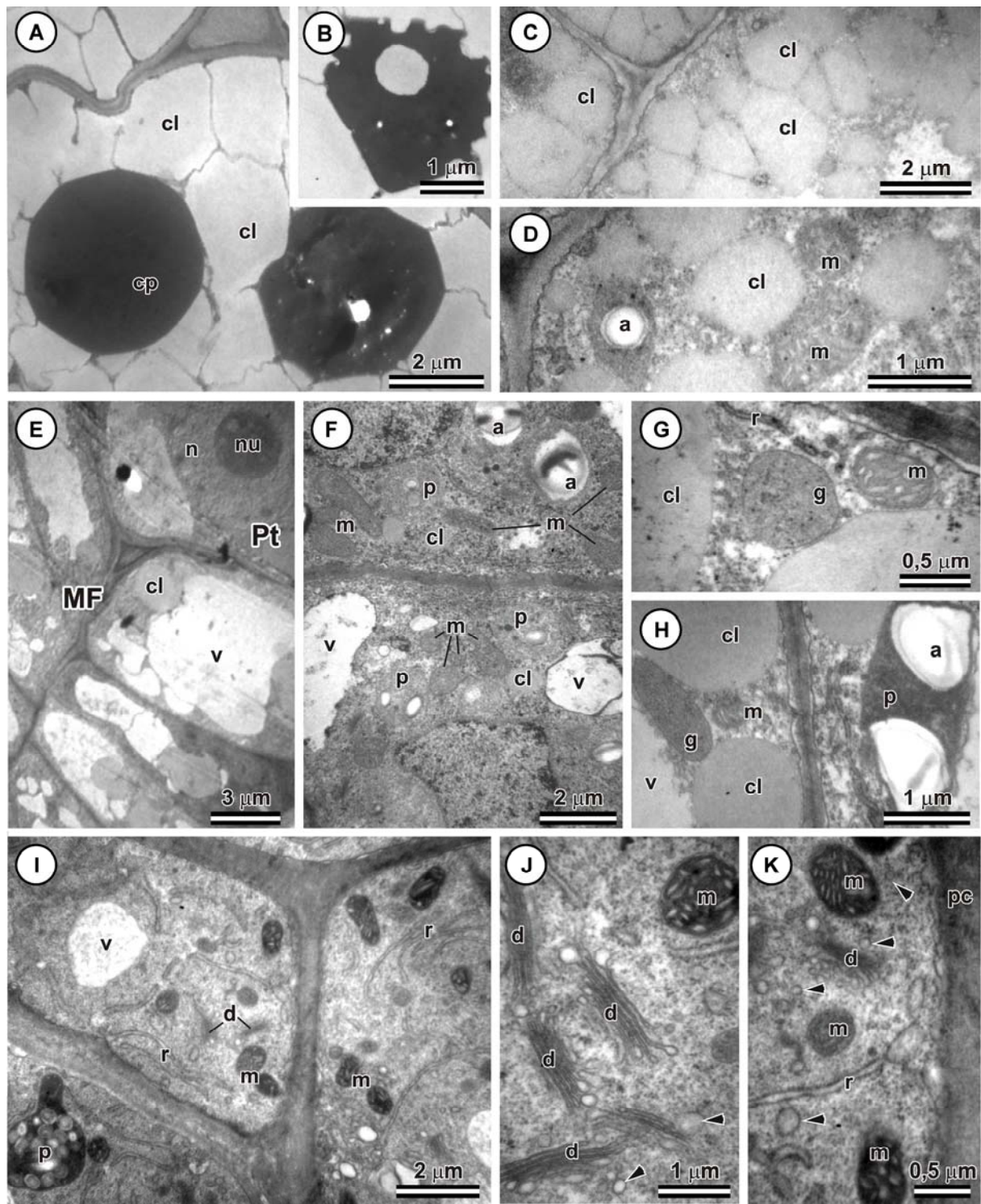


Figura 5. Células cotiledonares de *Passiflora cincinnata* durante os estádios iniciais do processo de embriogênese somática em microscopia eletrônica de transmissão. (A) Após 12 horas de embebição em água: citoplasma preenchido com corpos proteicos e corpos lipídicos. (B) 1 dia de cultivo: corpos proteicos com invaginações. (C, D) 4 dias de cultivo: Presença de corpos lipídicos, mitocôndrias e amiloplastos. (E-H) Início da formação das protuberâncias. (E) Visão geral. (F) Células da protoderme com citoplasma denso e grande população de mitocôndrias. (G, H) Células do meristema fundamental evidenciando a presença de glioxissomos, corpos lipídicos e grãos de amido. (I-K) Zonas pró-embriogênicas. Células com citoplasma denso contendo mitocôndrias, retículo endoplasmático e dictiossomos ativos na produção de vesículas (►). Abreviaturas: a, amido; cl, corpo lipídico; cp, corpo proteico; d, dictiossomo; g, glioxissomo; m, mitocôndria; n, núcleo; nu, nucléolo; p, plastídeo (amiloplasto); pc, parede celular; r, retículo endoplasmático; v, vacúolo.

CAPÍTULO 2

Organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) a partir de explantes radiculares: aspectos anatômicos e ultraestruturais

Resumo – Objetivou-se caracterizar os eventos anatômicos e aspectos ultraestruturais envolvidos na regeneração direta e indireta de *Passiflora edulis*, via organogênese *in vitro*. Explantes radiculares foram cultivados em meio de indução MS suplementado com 2,35 μ M de BA. Raízes em diferentes estádios de desenvolvimento foram processadas para microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão. Os padrões de regeneração direta e indireta foram observados em explantes radiculares. Na organogênese direta, a origem das respostas morfogênicas variou com o estágio de desenvolvimento das raízes. Os explantes em crescimento primário formaram gemas e primórdios foliares a partir de meristemoides originados do periciclo, enquanto que nos explantes em crescimento secundário, os meristemoides se originaram a partir do câmbio vascular. Foram observados nódulos organogênicos e a diferenciação de primórdios foliares na periferia dessas estruturas. Na organogênese indireta, a formação de gemas ocorreu via meristemoides, a partir das camadas periféricas dos calos que, por sua vez, se diferenciaram da região cortical do explante inicial. Independente do padrão de regeneração, os meristemoides apresentaram características ultraestruturais similares, embora diferenças no formato nuclear de células de meristemoides formados direta e indiretamente tenham sido relatadas. Esses resultados constituem informações importantes para estudos que visam a utilização de raízes como explante em protocolos de transformação genética, bem como a otimização dessa técnica em *Passiflora*.

Palavras-chave: maracujá, *Passiflora edulis*, organogênese, meristemoide, anatomia, ultraestrutura

***In vitro* organogenesis of *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) from root explants:
anatomical and ultrastructural aspects**

Abstract - This study aimed to characterize the anatomical events and ultrastructural aspects involved in direct and indirect regeneration of *Passiflora edulis* via *in vitro* organogenesis. Root explants were cultured on MS induction medium supplemented with 2.35 μ M BA. Roots at different developmental stages were examined using standart techniques of light, scanning electron and transmission microscopy. Patterns of direct and indirect regeneration were observed in root explants. In direct organogenesis, the origin of morphogenic responses varied with the stage of root development. The explants at primary growth stage formed buds and leaf primordia from meristemoides originated in the pericycle, whereas the explants at secondary growth stage formed meristemoides from the vascular cambium. Organogenic nodules and differentiation of leaf primordia were observed at the periphery of these structures. In indirect organogenesis, bud formation occurred via meristemoids from the peripheral cell layers of the calli, which, in turn, differentiated from the cortical region of the starting explant. Regardless of the regeneration pattern, meristemoids showed similar ultrastructural characteristics, although differences in the nuclear shape of cells from meristemoides formed directly and indirectly have been reported. These results provide important information for studies that use root explants in genetic transformation protocols as well as the optimization of this technique in *Passiflora*.

Key words: Passion fruit, *Passiflora edulis*, organogenesis, meristemoides, anatomy, ultrastructure

Introdução

O maracujazeiro apresenta importância econômica crescente na fruticultura mundial (CEAGESP, 2009). No Brasil, maior produtor da fruta, *Passiflora edulis* Sims é a principal espécie cultivada, apresentando cerca de 90% da área de plantio comercial do gênero (Junqueira et al. 2005), sendo a produção dos frutos destinada, principalmente, ao mercado *in natura* e indústrias de suco.

O cultivo de *P. edulis* estende-se por todo o território nacional. No entanto, a suscetibilidade dessa espécie ao potivírus *Cowpea aphid-borne virus* (CABMV) e à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, tem limitado a produção dos frutos e a expansão da cultura. Esses patógenos estão disseminados pelas principais áreas de produção e causam doenças consideradas de difícil controle (Brancaglione et al. 2009; Maciel et al. 2009), uma vez que não são encontradas fontes de resistência ou tolerância a essas doenças em bancos de germoplasma (Vieira e Carneiro 2004; Trevisan et al. 2006; Zerbini et al. 2008).

Como alternativa ao melhoramento genético convencional, técnicas de transformação genética tem sido empregadas para o controle de doenças causadas por bactérias e vírus em *Passiflora* (Vieira e Carneiro 2004; Alfenas et al. 2005; Trevisan et al. 2006; Zerbini et al. 2008). Porém, a baixa frequência de regeneração e alongamento de gemas transformadas, obtidas pelos sistemas de regeneração *in vitro*, tem impossibilitado o uso rotineiro da técnica (Trevisan et al. 2006; Zerbini et al. 2008).

O estudo do desenvolvimento de sistemas de regeneração podem auxiliar a otimizar a eficiência do mesmo (Almeida et al. 2006), bem como, na seleção e validação desses para serem utilizados em protocolos de transformação genética, uma vez que essas informações podem contribuir para o estabelecimento de parâmetros físicos da transformação, por biobalística, como posicionamento dos explantes e direcionamento do bombardeamento de partículas (Lenis-Manzano et al. 2010).

A utilização de raízes, em sistemas de regeneração *in vitro*, estabelecidos para as espécies de *Passiflora*, tem mostrado grande potencial regenerativo devido à alta taxa de formação de gemas quando comparadas a outras fontes de explantes não meristemáticos (Lombardi et al. 2007). Além disso, seu uso apresenta uma vantagem particular para estudos de transformação genética mediados por *Agrobacterium rhizogenes* (Reis et al. 2007).

Em *P. edulis*, a caracterização anatômica e ultraestrutural de meristemoides formados a partir de discos foliares e hipocótilos foram cruciais para compreensão da baixa taxa de regeneração obtidos a partir desses explantes (Fernando et al. 2007). A superioridade dos explantes hipocotiledonares foi ressaltada, sendo sua utilização recomendada para programas

de transformação genética da espécie (Fernando et al. 2007). Contudo, em explantes radiculares, estudos dessa natureza não foram realizados.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o processo de regeneração via organogênese *in vitro*, a partir de explantes radiculares, de *P. edulis* Sims, identificando células e/ou tecidos envolvidos no processo morfogênico em ambos os padrões, direto e indireto de regeneração.

Material e métodos

Material vegetal e indução de organogênese *in vitro*

A indução da organogênese *in vitro* de *P. edulis*, a partir de explantes radiculares, foi realizada conforme descrito por Silva (2009). Sementes de *P. edulis*, população FB-100 Maguary, foram cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda., localizada no município de Araguari, MG (18° 39' 15'' S e 48° 08' 52'' O).

As sementes tiveram os tegumentos removidos e, em seguida, foram desinfestadas e enxaguadas com água deionizada e autoclavada. Posteriormente, foram transferidas para 20 frascos de vidro (250 ml de capacidade) vedados com tampa plástica com dois filtros MilliSeal® Air Vent (Millipore, Japão). Cada frasco continha 40 ml de meio de cultura e 10 sementes por frasco, totalizando 200 sementes. A composição do meio de cultura consistiu de sais básicos MS (Murashige e Skoog, 1962), à metade de sua concentração, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al. 1968), 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose e 0,25% (p/v) de agente gelificante Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), pH $5,7 \pm 0,1$. Todos os frascos foram mantidos no escuro por 15 dias e a germinação das sementes ocorreu nessa condição. Após esse período, as plântulas foram transferidas para o ambiente controlado de sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes 20 W (Osram luz do dia, Brasil) e temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$. As plântulas permaneceram nessa condição por mais 15 dias.

Sob condições assépticas, raízes de 40 a 70 mm de comprimento de plântulas com 30 dias foram excisadas e subdivididas em fragmentos de 10 a 20 mm. Segmentos adjacentes ao hipocótilo não eram utilizados. Esses explantes foram transferidos para placas de Petri de poliestireno cristal estéreis 90 X 15 mm (J. Prolab, Brasil), contendo 25 mL de meio de cultura, consistido de sais básicos MS, complexo vitamínico B5, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, 0,25% (p/v) de agente gelificante (Phytigel, Sigma Chemical Company, USA) e $2,35 \mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BA), pH $5,7 \pm 0,1$. As placas foram vedadas com

adesivo acrílico (Nexcare Micropore 3M, Brasil) e mantidas nas mesmas condições de luminosidade e temperatura descritas anteriormente. Foram inoculadas 40 placas, cada uma contendo 12 explantes radiculares.

Preparação das amostras para análises microscópicas

Para as análises anatômicas e ultraestruturais, explantes radiculares de *P. edulis* foram coletados diariamente até o quarto dia de cultivo e, posteriormente, a cada dois, dias num período de 30 dias após a indução da organogênese. As amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM] (Karnovsky, 1965) modificado.

Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos, as amostras fixadas foram desidratadas em série com concentração crescente de etanol e infiltradas e polimerizadas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (O' Brien e McCully, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Permunt. A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) do laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, secas ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha), afixadas sobre suportes de alumínio com fita de carbono dupla face e metalizada com ouro (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). A investigação e a documentação foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra), do Núcleo de apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

Para análise ultraestrutural, as amostras fixadas foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato a 0,05M, desidratadas em série de concentração crescente de acetona, infiltradas e polimerizadas em resina epóxica Spurr (Spurr, 1969). Os blocos foram preparados para ultramicrotomia num desbastador (EM Trim, Leica Microsystems Inc., USA). Secções com 70 nm de espessura foram obtidas em um ultramicrotomo (Leica UC6, Leica Microsystems Inc., USA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, em 50 kV, com câmera digital acoplada (EM900, Zeiss, Alemanha) do NAP/MEPA-ESALQ/USP.

Resultados

Estudos anatômicos e micromorfológicos

Os padrões de regeneração direta e indireta foram observados em explantes radiculares de *Passiflora edulis*.

Na organogênese direta, a origem das respostas variou de acordo com o estágio de desenvolvimento dos explantes. Nas raízes em crescimento primário e início de crescimento secundário, gemas e primórdios foliares surgiram a partir da proliferação de células do periciclo (Figs 1A-C). No explante inicial, esse tecido era constituído por uma camada de células (Fig. 1A). Após três dias em meio de indução, divisões periclinais de células do periciclo foram observadas em regiões distantes da superfície de seccionamento do explante (Fig. 1B). Esse processo de divisão originou zonas de proliferação que, após 6 dias de cultivo, eram constituídos por várias camadas de células (Fig. 1C).

Após 8 dias em meio de indução, células da zona de proliferação adquiriram características meristemáticas e se tornaram isoladas das demais, formando meristemoides (Fig. 1D). As células que constituíam os meristemoides apresentaram citoplasma denso, núcleos volumosos e nucléolos evidentes. O contínuo desenvolvimento dos meristemoides (Fig. 1E) promoveu o rompimento do córtex e da epiderme da raiz, culminando na diferenciação de primórdios foliares (Figs. 2A, B) ou gemas (Figs. 1F, G). As gemas surgiram endogenamente a partir do 16º dia de cultivo e a conexão vascular entre essas e o explante foi acróptera (Fig. 1G)

Nas raízes em crescimento secundário, meristemoides foram observados nas camadas periféricas do câmbio vascular (Fig. 2C). Além de primórdios foliares e gemas, muitos desses se diferenciaram em nódulos organogênicos constituídos por um conjunto de células parenquimáticas, envolvidas por epiderme unisseriada contínua que, juntamente com as camadas subepidérmicas, formam a região periférica dessa estrutura (Figs. 2D). A partir das células periféricas dos nódulos organogênicos ocorre a diferenciação de primórdios foliares e gemas (Figs. 2D, E).

Na organogênese indireta, a formação de calos ocorreu a partir de células do córtex, principalmente, nas extremidades dos explantes radiculares, nos locais de excisão. As células corticais apresentaram hipertrofia após sucessivas divisões (Fig. 2F). Essas células hipertrofiadas se dividiram diversas vezes, formando várias células filhas delimitadas pela parede celular da célula de origem. O desenvolvimento de meristemoides foi observado nas camadas periféricas dos calos, a partir de células das camadas mais internas do córtex (Fig. 2F). Como verificado na via organogênica direta, os meristemoides se diferenciaram em gemas e/ou nódulos (Fig. 2G).

O processo organogênico em explantes radiculares de *P. edulis* foi assincrônico. Estruturas foliares, gemas e nódulos organogênicos, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram observadas no mesmo explante e em outros com diferentes dias de cultivo *in vitro*.

Aspectos ultraestruturais

Os meristemoides formados diretamente, a partir da proliferação do periciclo apresentaram citoplasma denso, núcleo esférico e nucléolo proeminente, sendo que, em algumas células, os núcleos possuíam mais de um nucléolo (Figs. 3A-D). Os vacúolos eram pouco desenvolvidos e a maioria possuía pequeno porte (Fig. 3A). As mitocôndrias eram numerosas, predominantemente globosas (Fig. 3A). Os dictiossomos encontravam-se nas proximidades da parede celular. Eram constituídos por poucas cisternas cada e apresentaram-se ativos na produção de vesículas (Figs. 3A, C).

A formação das placas celulares a partir do acúmulo e fusão de vesículas foi verificada nos meristemoides (Fig. 3B). Foram observados também, plasmodesmos distribuídos por todas as paredes formadas entre as células adjacentes dos meristemoides (Fig. 3C).

Meristemoides originados indiretamente, a partir de calos, apresentaram características ultraestruturais similares aos meristemoides formados diretamente, no entanto, diferenças nucleares foram visualizadas. Nessas células, o núcleo apresentou numerosos poros nucleares

evidentes (Figs. 3E, F) e formação progressiva de invaginações da membrana, causando irregularidades no formato do envelope nuclear (Fig. 3G). Ocasionalmente, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso foram observados no interior dessas projeções (Figs. 3H, I). Núcleos com formato lobado também foram observados em células do calo não envolvidas no processo de regeneração.

Discussão

No presente estudo, reportam-se os eventos anatômicos e aspectos ultraestruturais envolvidos na regeneração de *Passiflora edulis*, a partir da cultura de raízes em meio semi-sólido de indução. O uso de explantes radiculares para regeneração *in vitro* é limitado a poucas espécies (Vila et al. 2005). Em *Passiflora*, a utilização dessa fonte de explante foi descrita com sucesso, somente, na regeneração de *P. cincinnata*, via organogênese direta e indireta (Lombardi et al. 2007) e via embriogênese somática (Reis et al. 2007).

A iniciação organogênica direta, em *P. edulis*, a partir de células do periciclo e câmbio vascular era esperada, pois essas constituem regiões meristemáticas do corpo vegetal (Evert 2006; Smet et al. 2006). A formação de gemas a partir desses tecidos tem sido relatada em diferentes espécies (Vinocur et al. 2000; Vila et al. 2005; Lombardi et al. 2007). Esses resultados reforçam o conceito de pluripotência do periciclo, uma vez que essas células são sítios diretos de iniciação de raízes laterais (Casimiro et al. 2003; Smet et al. 2006) mas que, sob condições adequadas, podem estar envolvidas também, na formação de meristemas caulinares (Che et al. 2007; Atta et al. 2009).

Em *Arabidopsis*, a regeneração via organogênese direta a partir de células do periciclo de explantes radiculares, ocorreu em locais de formação de raízes laterais e a partir de estruturas denominadas “protuberâncias similares a meristemas de raízes laterais” (Atta et al. 2009). Semelhantemente, em *P. edulis*, relatamos a regeneração de meristemas caulinares e primórdios foliares em estruturas nodulares que se formaram a partir de células do periciclo e câmbio vascular, sugerindo a equivalência das protuberâncias descritas em *Arabidopsis* e os nódulos organogênicos, caracterizados no presente estudo.

A diferenciação de nódulos organogênicos tem sido relatada em sistemas de regeneração *in vitro* de diversas espécies vegetais (Fortes e Pais 2000; Moyo et al. 2009; Sahai et al. 2010). Em alguns casos, tais estruturas foram interpretadas como embriões somáticos anormais, baseado na sua morfologia, geralmente, globular (Haensch 2004).

Porém, a conexão dessas estruturas com o explante, ausência de bipolaridade e a diferenciação de primórdios foliares e ou gemas na sua superfície não suportam essa hipótese.

Em *P. edulis* a formação de nódulos organogênicos foram anteriormente descritas em explantes foliares e hipocotiledonares, via organogênese direta e indireta (Fernando et al. 2007), sendo a organização histológica dos nódulos formados a partir de raízes, observada neste estudo, semelhante à descrita em explantes hipocotiledonares.

A regeneração de estruturas foliares, como observado nos explantes radiculares de *P. edulis*, é frequente em *Passiflora* (Appezzato-da-Glória et al. 2005). No entanto, essa rota morfogênica restringe a eficiência do sistema de regeneração, devido a ausência do meristema caulinar. Esse fenômeno foi detectado em explantes foliares de *P. alata*, que apresentaram alta responsividade, porém baixa taxa de alongamento devido à regeneração de, somente, estruturas foliares (Pinto et al. 2010). Contudo, deve-se salientar que nos explantes radiculares de *P. edulis*, a formação de estruturas foliares não foi uma rota preferencial uma vez que, a diferenciação de meristemoides em gemas apresenta elevada frequência (Silva 2009).

Assim como em *P. edulis*, a formação de calos a partir de divisões celulares da região cortical de explantes radiculares foi relatada em *Curcuma zedoaria*. Nessa espécie, células corticais também sofreram hipertrofia e a formação de gemas ocorreu via meristemoides nas camadas periféricas dos calos (Melo et al. 2001). A formação dessa massa a partir de tecidos diferenciados, como o parênquima cortical, pode resultar em alta percentagem de variação somaclonal (Bordallo et al. 2004). O formato irregular do núcleo, evidenciado pelas invaginações e a presença de complexos de poros nucleares em células do calo e meristemoides formados indiretamente em *P. edulis*, corrobora com essa hipótese. A irregularidade nuclear é um marcador de possíveis ocorrências de amitoses (Tylicki et al. 2002; Appezzato-da-Glória e Machado 2004). Esse processo está relacionado à fragmentação nuclear, podendo comprometer a estabilidade genética de gemas regeneradas, inviabilizando assim o uso do padrão indireto de regeneração para a multiplicação clonal e em sistemas de transformação genética. Futuras análises de citometria de fluxo são necessárias a fim de confirmar a estabilidade de ploidia de plantas de *P. edulis* regeneradas via modo indireto.

As características ultraestruturais observadas nos meristemoides de *P. edulis* como citoplasma denso, grande número de mitocôndrias e dictiossomos e núcleos proeminentes, foram similares às descritas em meristemoides de *Glycine max* e *Bauhinia forficata* (Appezzato-da-Glória e Machado 2004). Grande número de mitocôndrias evidencia a alta demanda energética dessas células, além de ser uma característica comum em tecidos em processo de diferenciação (Pihakaski-Maunsbach et al. 1993). Em meristemoides de *Glycine max*, o aumento do número de dictiossomos, tipicamente envolvidos na liberação de materiais

no apoplasto, foi associado à aceleração da síntese de componentes da parede celular (Appezatto-da-Glória e Machado, 2004) e da mesma forma foi interpretado em *P. edulis* pois a formação de placas celulares foram comuns nessa região. As numerosas conexões citoplasmáticas encontradas em células adjacentes dos meristemoides indicam intensa interação via simplasto. Plasmodesmos são comuns em células meristemáticas pluripotentes, uma vez que essas conexões são essenciais para o movimento intracelular de sinais envolvidos no controle da via de diferenciação dessas células (Verdeil et al. 2007).

No presente estudo, foi descrito o processo de organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* a partir de explantes radiculares, bem como, reportadas as características ultraestruturais de células envolvidas nos diferentes padrões de regeneração (direto e indireto). Esses resultados constituem informações importantes para o melhor entendimento da via organogênica em *Passiflora*, subsidiando pesquisas relacionadas à caracterização de eventos moleculares associados à pluripotência de células envolvidas nesse processo de regeneração, bem ainda para estudos que visem à utilização de raízes como explantes em protocolos de transformação genética dessa espécie.

Agradecimentos

À equipe técnica do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (ESALQ/USP), pelo auxílio na preparação das amostras e uso dos microscópios eletrônicos, ao Viveiro Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG), pelo fornecimento de sementes da população FB-100 Maguary e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Alfenas PF, Braz ASK, Torres LB, Santana EN, Nascimento AVS, Carvalho MG, Otoni WC, Zerbini FM (2005) Transgenic passionfruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatologia Brasileira* 30:33-38. doi: 10.1590/S0100-41582005000100006
- Almeida WAB, Mourão Filho FAAW, Mendes BMJ, Rodriguez, APM (2006) Histological characterization of in vitro adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum* 50:321-325. doi: 10.1007/s10535-006-0044-y

- Appezzato-da-Glória B, Machado SR (2004) Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. *Revista Brasileira de Botânica* 27:429-437. doi: 10.1590/S0100-84042004000300004
- Appezzato-da-Glória B, Fernando JA, Machado SR, Vieira MLC (2005) Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 387–407
- Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarch A, Carnero E, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *The Plant Journal* 57:626-644. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03715.x
- Biasi LA, Falco MC, Rodriguez APM, Mendes BMJ (2000) Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agricola* 57:661-665. doi: 10.1590/S0103-90162000000400010
- Bordallo PN, Silva DH, Maria J, Cruz CD, Fontes EP (2004) Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. *Horticultura Brasileira* 22:300-304. doi: 10.1590/S0102-05362004000200027.
- Brancaglione P, Sampaio AC, Fischer IH, Almeida AM, Fumis TF (2009) Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *in vitro* e em mudas de maracujazeiro amarelo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:718-724. doi: 10.1590/S0100-29452009000300014
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalarao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8:165-171. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7
- CEAGESP (2009) Comercialização do maracujá azedo. Em: Seção de economia e desenvolvimento. <http://www.ceagesp.gov.br>.
- Che P, Lall S, Howell SH (2007) Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* 227:1183-1194. doi: 10.1007/s00425-007-0565-4
- Evert RF (2006) *Esau's Plant Anatomy, meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd edn. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Fernando JA, Vieira MLC, Machado SR, Appezzato-da-Gloria B (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91:37-44. doi: 10.1007/s11240-007-9275-7

- Fortes AM, Pais MS (2000) Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany* 87:971-979. doi: 10.2307/2656996
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Haensch KT (2004) Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Cell Reports* 22:376-381. doi: 10.1007/s00299-003-0726-2
- Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 80-108
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138
- Lenis Manzano SJ, Araujo ACG, Valle CB, Santana EF, Carneiro VTC (2010) Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:435-44. doi: 10.1590/S0100-204X2010000500001
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239-247. doi: 10.1590/S1516-89132007000200009
- Maciel SC, Nakano DH, Rezende JAM, Vieira MLC (2009) Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. *Scientia Agricola* 66:414-418. doi: 10.1590/S0103-90162009000300018
- Melo MO, Melo M, Appezzato-da-Glória B (2001) Histological of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Brazilian Archives of Biology Technology* 44:197-203. doi: 10.1590/S1516-89132001000200014
- Moyo M, Jeffrey FF, Staden JV (2009) In vitro morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 98:273-280. doi: 10.1007/s11240-009-9559-1
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty, Melbourne.
- Pihakashi-Maunsbach K, Nygaard KB, Jensen KH, Rasmussen O (1993) Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by light and electron microscopy. *Physiologia Plantarum* 87:167-176. doi: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb00139.x
- Pinto AP, Monteiro-Hara ACBA, Stipp LCL, Mendes BM J (2010) *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46:28-33. doi: 10.1007/s11627-009-9251-5
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Pinto DLP, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738:425-431
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208.
- Sahai A, Shahzad A, Sharma S (2010) Histology of organogenesis and somatic embryogenesis in excised root cultures of an endangered species *Tylophora indica* (Asclepiadaceae). *Australian Journal of Botany* 58:198-205. doi: 10.1071/BT09220
- Silva CV (2009) Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 82p.
- Smet I, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* 60:871-887. doi: 10.1007/s11103-005-4547-2
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26:31-43. doi: 10.1016/S0022-5320(69)90033-1
- Trevisan F, Mendes BMJ, Maciel SC, Vieira MLC, Meleti LMM, Rezende JAM (2006) Resistance to *Passion fruit* woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. *Plant Disease*, 90:1026-1030. doi: 10.1094 / PD-90-1026
- Tylicki A, Wojciech B, Malepszy S, Kulawiec M, Kuraś M (2002) Structural and ultrastructural analysis of *Solanum lycopersicoides* protoplasts during diploid plant regeneration. *Annals of Botany* 90:269-278. doi: 10.1093/aob/mcf186
- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science* 12:245-252. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002
- Vieira MLC, Carneiro MS (2004) *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI, Oxford, pp 435-453

- Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski L (2005) Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 41:746–751. doi: 10.1079/IVP2005692
- Vinocur B, Carmi T, Altman A, Ziv M (2000) Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) root cultured in liquid media. *Plant Cell Reports* 19:1146-1154. doi: 10.1007/s002990000243
- Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Passionfruit. In: Kole C, Hall TC (eds) A compendium of transgenic crop plants, v.5, Tropical and subtropical fruit and nuts, 1st edn. Wiley, Berlin, pp 213-23

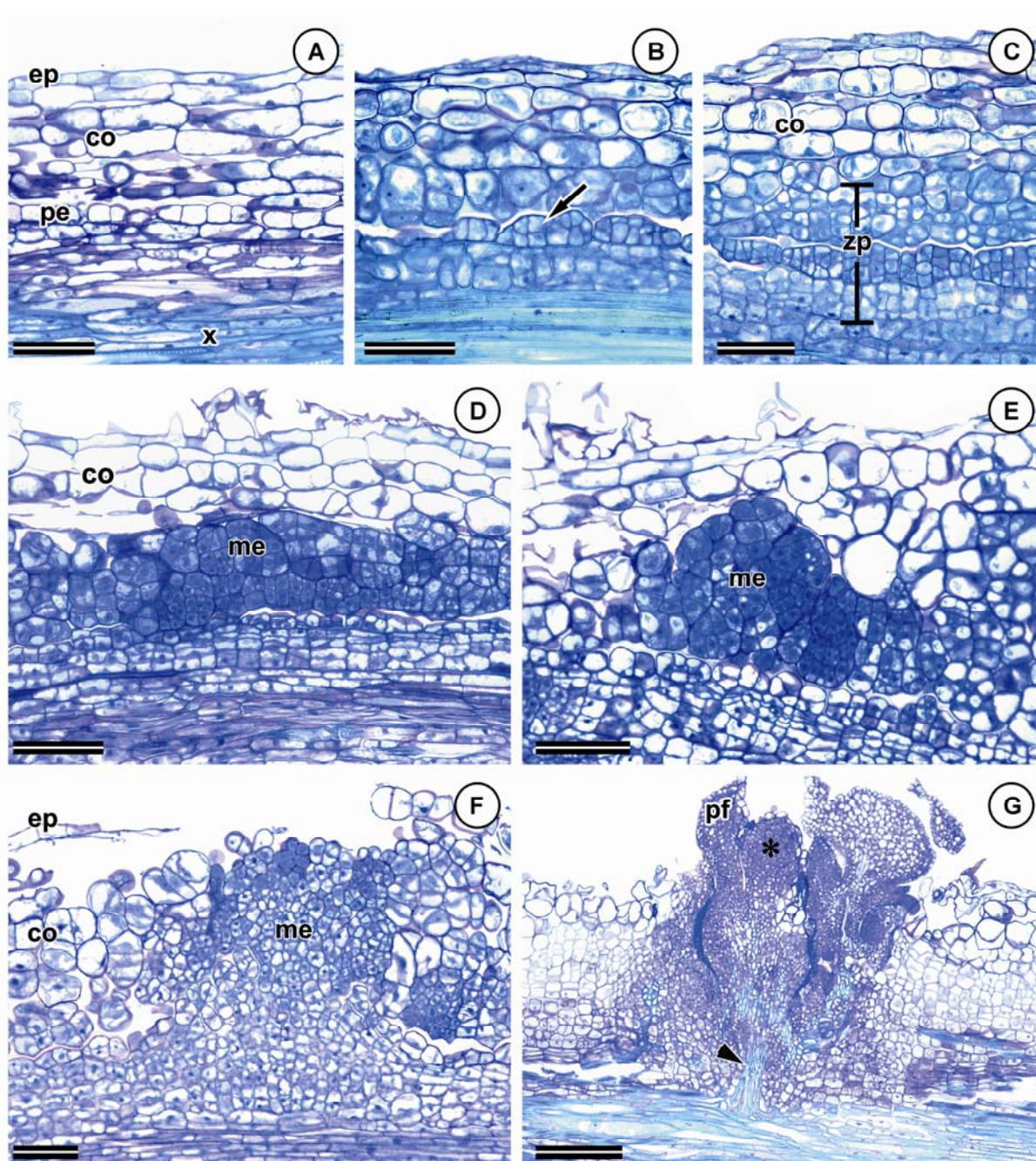


Figura 1. Organogênese direta obtida a partir de explantes radiculares de *Passiflora edulis*. Secções longitudinais. (A) Segmento de raiz utilizado como explante inicial na indução. (B, C) Mesma região após 3 e 6 dias em meio de indução, respectivamente. Divisões periclinais do periciclo (seta preta), formando uma zona de proliferação (zp). (D, E) Formação e início do desenvolvimento dos meristemoides. (F) Desenvolvimento dos meristemoides. Rompimento do córtex e epiderme. (G) Gema desenvolvida (*). Conexão vascular com o explante (►). Abreviaturas: co, córtex; ep, epiderme; me, meristemóide; pe, periciclo; pf, primórdio foliar; x, xilema; zp, zona de proliferação. Barras = 100 µm.

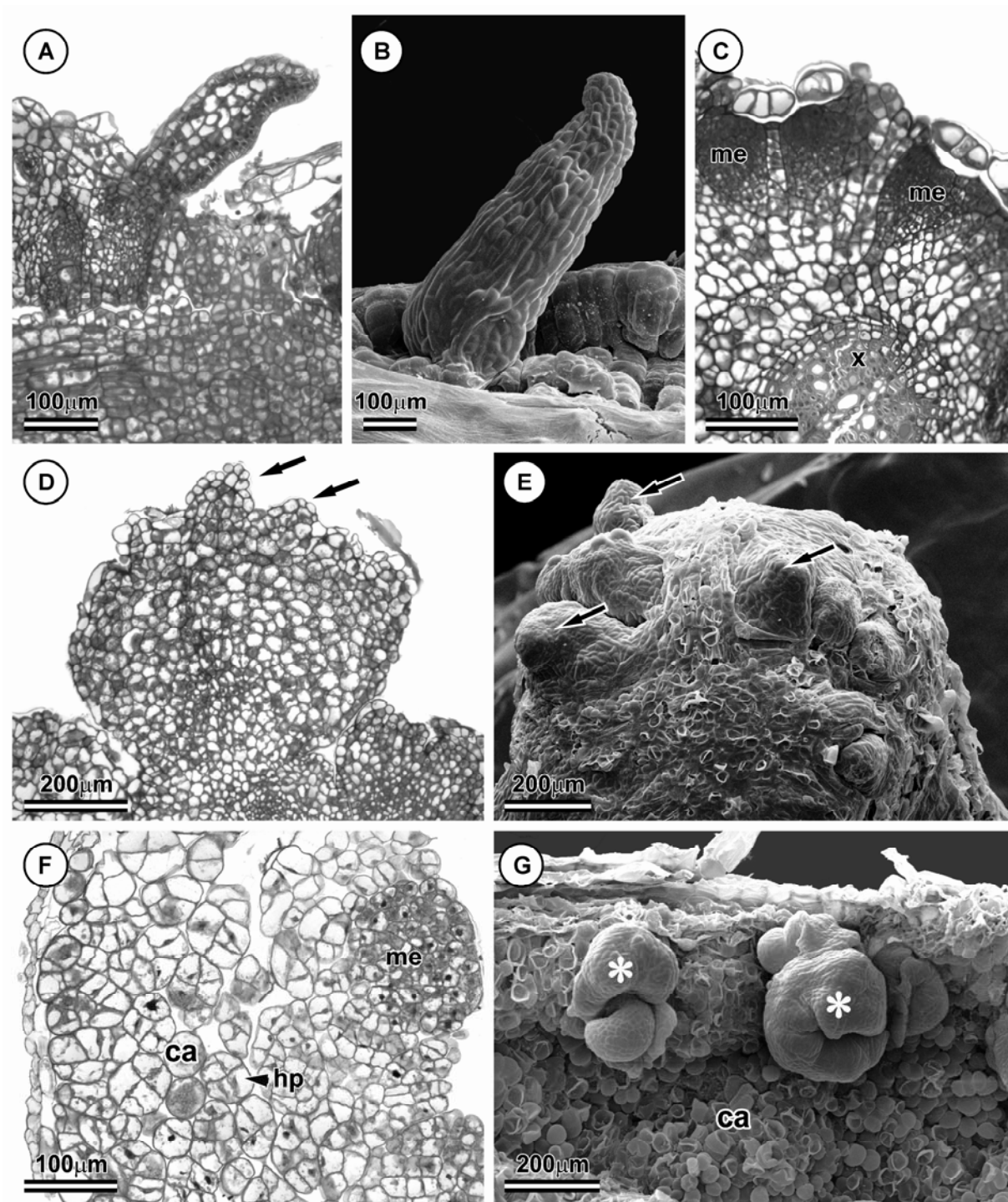


Figura 2. Organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis*. (A, C, D, F) Microscopia de luz. (B, E, G) Micrografias eletrônicas de varredura. (A, B) Primórdios foliares. (C) Formação de meristemóides no cambio vascular. (D, E) Nódulos organogênicos. Formação de primórdios foliares na periferia dos nódulos (setas). (F) Meristemóide formado na periferia do calo. (G) Organogênese indireta. Notar a presença de gemas (*). Abreviaturas: ca, calo; hp, hipertrofia; me, meristemóide; x, xilema.

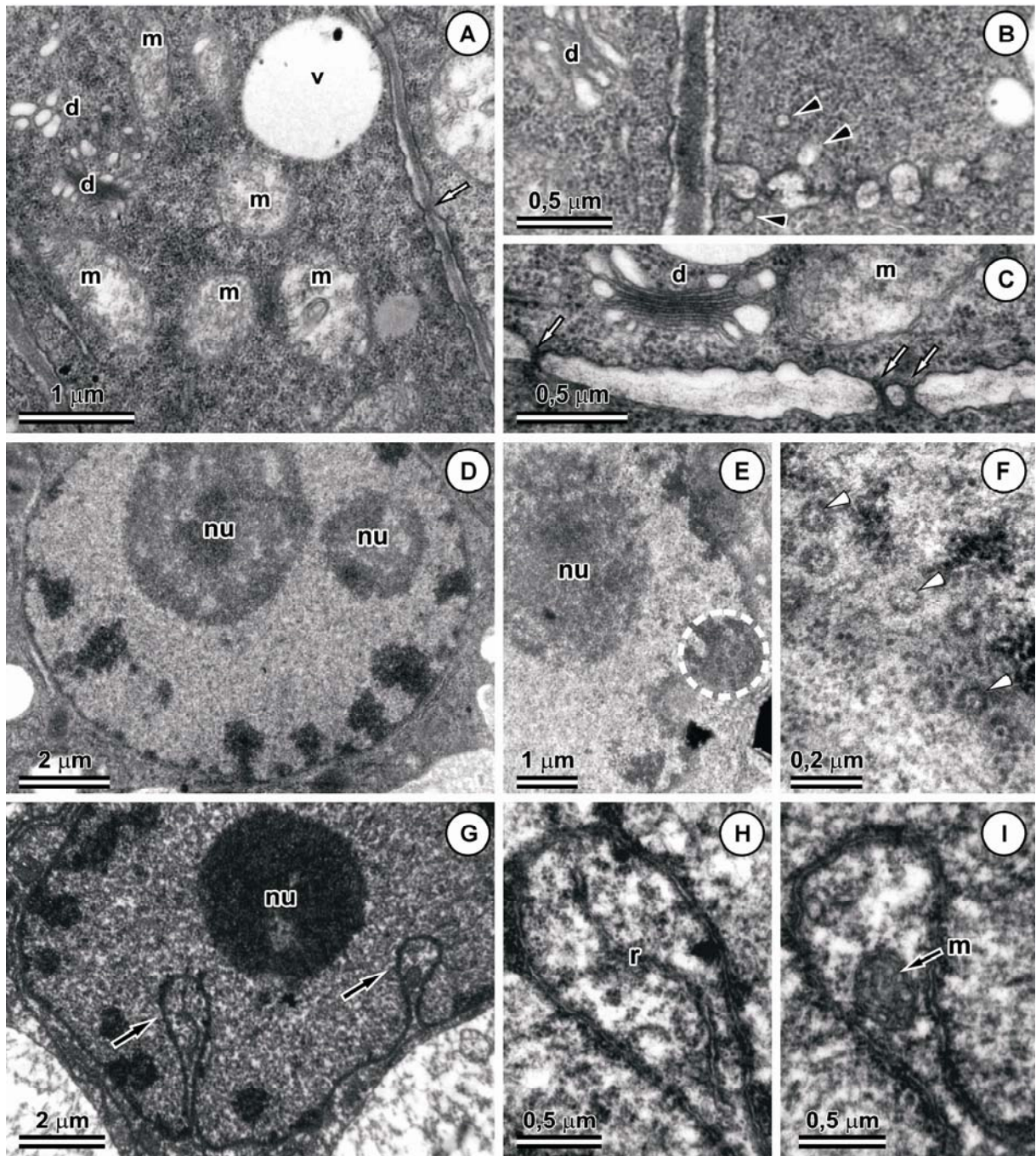


Figura 3. Células de meristemoides e de calo de *Passiflora edulis* em microscopia eletrônica de transmissão. (A-D) Meristemoides formados por via direta. (A) Células com citoplasma denso contendo mitocôndrias e dictiossomos. (B) Placa celular em formação. Notar a presença de vesículas (cabeça de seta preta). (C) Plasmodesmos (seta branca). (D) Núcleo esférico, regular, contendo nucléolos proeminentes. (E-F) Meristemoides formados via indireta. (E) Núcleo com formato irregular, apresentando complexo de poros nucleares (detalhe). (F) Poros nucleares (cabeça de seta branca). (G-I) Células do calo. (G) Invaginações na membrana nuclear (seta preta). (H, I) Retículo e mitocôndrias no interior das invaginações, respectivamente. *Abreviaturas:* d, dictiossomos; m, mitocôndrias; nu, nucléolo; r, retículo endoplasmático rugoso; v, vacúolo; (seta branca), plasmodesmos.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, constatou-se que os embriões somáticos de *Passiflora cincinnata* originaram-se via padrão multicelular, a partir das camadas periféricas de protuberâncias formadas pela proliferação meristemática de células da protoderme e do meristema fundamental dos cotilédones. A mobilização total e parcial de proteínas e lipídeos, respectivamente, nos estádios iniciais do processo de embriogênese somática não coincidiu com as alterações estruturais, porém mudanças citológicas foram descritas nesse estágio inicial, suportando a idéia de que componentes de reserva são necessários para reorganização e diferenciação celular.

No processo de organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis*, meristemoides originados via organogênese direta foram formados a partir de células do periciclo ou do câmbio vascular, dependendo do estágio de desenvolvimento do explante. Na organogênese indireta, meristemoides foram formados nas camadas periféricas dos calos, que por sua vez se diferenciaram da região cortical do explante. Meristemoides formados via sistema direto apresentaram núcleos esféricos com um ou mais nucléolos proeminentes, características não visualizadas naqueles formados indiretamente, que possuíam núcleos lobados com complexos de poros nucleares evidentes.

Os resultados relatados no presente trabalho constituem informações importantes para o entendimento dessas vias morfogênicas em *Passiflora*, subsidiando investigações relacionadas à caracterização de eventos moleculares nesses sistemas de regeneração, bem ainda para estudos que visem à utilização desses sistemas em protocolos de transformação genética dessas espécies.