

LEIDY YIBETH DEANTONIO FLORIDO

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, EXPRESSÃO DO GENE *SERK* EM *Passiflora ligularis* JUSS. E INFLUÊNCIA DA IRRADIÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO SECUNDÁRIO *in vitro* DE *P. mollissima* BAILEY H.B.K.

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

D284e  
2013 Deantonio Florido, Leidy Yibeth, 1985-  
Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss. e influência da irradiância no desenvolvimento e metabolismo secundário *in vitro* de *P. mollissima* Bailey H. B. K. / Leidy Yibeth Deantonio Florido. - Viçosa, MG, 2013.  
xi, 64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Passiflora*. 2. Regulação de expressão gênica. 3. Fitoquímicos.  
4. Biossíntese. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II.  
Título.

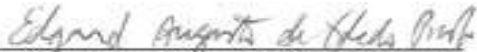
CDD 22. ed. 583.626

LEIDY YIBETH DEANTONIO FLORIDO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, EXPRESSÃO DO GENE *SERK* EM *Passiflora ligularis* JUSS. E INFLUÊNCIA DA IRRADIÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO SECUNDÁRIO *in vitro* DE *P. mollissima* BAILEY H.B.K.**

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

APROVADA: 18 de outubro de 2013

  
Edgard Augusto de Toledo Picoli

  
João Paulo Viana Leite

  
Andréa Djas Koehler

  
Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

*À meu irmão,  
Uriel Ferney Deantonio Florido (in memoriam),  
maior exemplo de amor, força e coragem,  
dedico*

*A minha família,  
Ao meu orientador,  
Ofereço*

## 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 da bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelo profissionalismo, amizade, apoio e, principalmente, paciência e confiança depositada em mim.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (UFV), pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof Sérgio Antonio Fernandes, do Laboratório de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB), pela disponibilidade e orientação nas análises fitoquímicas.

Aos mestres Marcos Vinicius Pinheiro e Diego Batista, pela ajuda nos experimentos.

À Dra Ana Claudia Ferreira da Cruz, pelo auxílio nas análises de Anatomia Vegetal.

À Dra Andréa Dias Koehler, pelo auxílio na técnica de hibridização *in situ*.

A todos os funcionários do programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (UFV), em especial ao José Maria por cuidar das plantas na casa de vegetação.

Ao pessoal do laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal, pelo suporte nas análises de microscopia de luz e testes histoquímicos.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), Maria, Anyela, Dona Elcy, Elyabe, Cris, João Paulo, Marcia Adriana, Ricardo, Gizelly, Peracio, Evelyn, Jéssica, Debora, Brener, Tiago, Natan, Maíra, Jaiza e aqueles outros colegas que conheci no LCT, pela alegre convivência com sabor a café, pela amizade, carinho e disponibilidade em ajudar.

À Elisonete Garcia Lani (Lili) pela amizade.

Aos meus colegas da equipe das *Passifloras* do LCT, Lorena e Bruno, pela amizade e carinho por este gênero.

Aos meus colegas de turma do Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, especialmente à Dora Martins, pelas horas de estudo e a amizade.

Ao grupo de estrangeiros em Viçosa, pela amizade e por criar um ambiente familiar durante a estadia no Brasil.

Aos amigos brasileiros Ana Claudia, Prof Claudio, Andrea, Poliana, Walas, e muitos outros, por permitir-me conhecer sua cultura e compartilhar muitos momentos.

À minha família, pelo apoio incondicional, amor e compreensão durante a realização do mestrado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e a realização do meu Mestrado.

## BIOGRAFIA

LEIDY YIBETH DEANTONIO FLORIDO, filha de Elizabeth Florido Vega e José Uriel Deantonio Arévalo, nasceu em Rondón, Boyacá – Colômbia o dia 10 de setembro de 1985.

Ingressou na Universidade Nacional da Colômbia sede Bogotá (UNAL) em fevereiro de 2003, concluindo o curso de Engenharia Agrônômica em setembro de 2008.

Durante os anos 2008, 2009 e 2011 a Engenheira esteve vinculada à Faculdade de Agronomia da Universidade Nacional de Colômbia sede Bogotá como Assistente Administrativa e de Pesquisa. No ano 2010, trabalhou como Assistente Técnica do setor Horto-frutícola e de batata com a Corporação Colômbia Internacional (CCI).

No segundo semestre de 2011 iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Cultura de Tecidos Vegetais *in vitro* de espécies de maracujazeiro concluindo o curso com a defesa da dissertação no dia 18 de outubro de 2013, sob a orientação do Dr. Wagner Campos Otoni.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
CAPITULO I .....	10
Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e caracterização da expressão do gene <i>SERK</i> em <i>Passiflora ligularis</i> Juss.....	10
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
2.1 Material vegetal e indução de calos embriogênicos .....	15
2.1.1 Avaliações e análises estatísticas .....	16
2.2 Meio de maturação dos embriões somáticos .....	16
2.3 Caracterização anatômica e teste histoquímico .....	16
2.3.1 Microscopia de luz.....	16
2.3.2 Teste Histoquímico .....	17
2.4 Análise da expressão do gene <i>SERK</i> de <i>P. ligularis</i> por hibridização <i>in situ</i> .....	17
2.4.1 Coleta e preparo dos tecidos .....	17
2.4.2 Síntese da sonda marcada com digoxigenina .....	18
2.4.3 Reação de hibridização .....	18
3. RESULTADOS .....	20
4. DISCUSSÃO .....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
CAPÍTULO II.....	34
<b>Influência da irradiância <i>in vitro</i> no desenvolvimento, perfil fitoquímico e teor de flavonoides e taninos em <i>Passiflora mollissima</i> Bailey H.B.K.</b> .....	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Material vegetal .....	39
2.2 Análise de crescimento e desenvolvimento vegetal .....	40
2.3 Análise fitoquímica.....	41
2.3.1 Obtenção dos extratos .....	41
2.3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	42
2.3.3 Testes histoquímicos para flavonoides, taninos e alcaloides .....	43
<b>2.3 Teor de flavonoides C-glicosilados e taninos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	43
<b>2.3.4 Avaliações e análises estatísticas</b> .....	44
3. RESULTADOS .....	46
3.1 Análises de crescimento e desenvolvimento vegetal .....	46
3.2 Prospecção fitoquímica.....	48
3.2.1 Rendimento extrativo.....	48
3.2.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	48
3.3 Presença de taninos na análise histoquímica .....	50

3.4 A luz na concentração de flavonoides C-glicosilados e taninos por CLAE .....	50
4. DISCUSSÃO .....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
CONCLUSÕES GERAIS.....	64

## RESUMO

DEANTONIO FLORIDO, Leidy Yibeth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013. **Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss. e influência da irradiância no desenvolvimento e metabolismo secundário *in vitro* de *P. mollissima* Bailey H.B.K.** Orientador: Wagner Campos Otoni.

O presente estudo abordou duas áreas da cultura de tecidos *in vitro* aplicada ao gênero *Passiflora*: a regeneração de plantas via embriogênese somática e a biossíntese de metabólitos secundários influenciados pela irradiância. Os objetivos do presente estudo foram estabelecer um protocolo de indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros caracterizando a expressão do gene *SERK* durante a morfogênese de *Passiflora ligularis*, e analisar a influência da irradiância no desenvolvimento vegetal e metabolismo secundário *in vitro* de *Passiflora mollissima*. No primeiro capítulo é apresentado um protocolo de indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos para *Passiflora ligularis* e a caracterização da expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ*. Embriões zigóticos maduros foram incubados em meio Murashige & Skoog (MS) suplementado com a combinação de 45,2  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,2  $\mu\text{M}$  de 6-benziladenina (BA) e 2,3  $\mu\text{M}$  de thidiazuron (TDZ) induzindo a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos em estágio globular com padrões similares a outras *Passifloras*. O teste histoquímico de dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Amostras coletadas aos 5, 15 e 35 dias no meio de indução e 5 dias no meio de maturação foram analisadas quanto a expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ* com sonda heteróloga de *Passiflora cincinnata* *SERK* (*PcSERK*) confirmando a expressão do gene, particularmente com um sinal forte ao quinto dia no meio de maturação. Para *P. ligularis* as informações deste estudo constituem o primeiro relato dos eventos de indução e expressão gênica da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos. No segundo capítulo objetivou-se avaliar a influência da irradiância no desenvolvimento vegetal e metabolismo secundário de vitroplantas de *Passiflora mollissima*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, os tratamentos foram constituídos de três níveis de irradiância fornecidos por lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) e fluorescentes (LF): 2LED ( $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 4LED ( $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 2LF ( $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Observou-se influência da irradiância no

crescimento e desenvolvimento das vitroplantas. O perfil fitoquímico foi realizado por meio da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), para os extratos de folhas, caules e raízes. Encontrou-se que os níveis de irradiância estimularam a biossíntese de taninos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides. Segundo a análise histoquímica, os taninos aloca-se nas raízes de *P. mollissima*. A concentração de flavonoides C-glicosilados (orientina, vitexina e isovitexina) e tanino (ácido tânico) foram determinados pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo constatada a interação entre a irradiância e o tipo de órgão na concentração destes compostos fenólicos. A irradiância fornecida com 2LED favorece o aumento na concentração de orientina ( $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e vitexina ( $6,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ) nas folhas, 4LED de isovitexina na raiz ( $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ), e 2LF de ácido tânico na raiz ( $1,99 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Para *P. mollissima* este é o primeiro relato da influência da irradiância no metabolismo secundário, o que contribui à realização de futuros trabalhos e melhoramento dos sistemas de produção de compostos fenólicos *in vitro* a partir desta espécie.

## ABSTRACT

DEANTONIO FLORIDO, Leidy Yibeth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2013. **Somatic embryogenesis, expression of the *SERK* gene in *Passiflora ligularis* Juss. and influence of irradiance in development and secondary metabolism *in vitro* in *P. mollissima* Bailey H.B.K.** Adviser: Wagner Campos Otoni.

The present study approached two different areas in plant tissue culture applied to *Passiflora*: plant regeneration through somatic embryogenesis and the secondary metabolite production as affected by light irradiance levels. This study aimed: to establish a protocol for somatic embryogenesis induction from mature zygotic embryos, also characterizing the *SERK* gene expression during morphogenesis in *Passiflora ligularis* Juss; and to assess the influences of light irradiance levels over vegetal development and secondary metabolism in *Passiflora mollissima*. The first chapter presents the protocol for somatic embryogenesis in *P. ligularis* and the *SERK* gene characterization through *in situ* hybridization. Mature zygotic embryos were incubated in Murashige and Skoog (MS) medium with 45.2  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2.2  $\mu\text{M}$  6-Benzyladenine (BA) and 2.3  $\mu\text{M}$  thidiazuron (TDZ), so inducing the formation of embryogenic *calli* and globular stage somatic embryos following patterns that are similar to other *Passiflora* species. The competence embryogenic of the material was confirmed by histochemical tests using Evans blue and acetic carmine double staining. Samples collected after 5, 15 and 35 days in inducing medium and 5 days in maturation medium were used to assess *SERK* gene expression through *in situ* hybridization using *Passiflora cincinnata* *SERK* (*PcSERK*) heterologous probe, thus confirming the expression of the gene, especially with a strong signal at fifth day in the maturation medium. This study represents the first report of the events involving induction and gene expression of somatic embryogenesis from zygotic embryos in *P. ligularis*. The second chapter aimed to determine the influence of irradiance levels over vegetal development and secondary metabolism in *P. mollissima*. The experiment was conducted in a completely randomized design, the treatments were three levels of irradiance provided by two types of lamps, light emitting diode (LED) and fluorescent (LF): 2LED (33  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 4LED (57  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 2LF (21  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Influences of irradiance levels over plant development were observed. Phytochemical profiles were obtained through thin layer chromatography (TLC) for roots, stems and

leaves extracts. Irradiance levels stimulated tannin, terpenoid, steroid, saponin and flavonoid biosynthesis. Histochemical analyses showed that tannins are allocated in *P. mollissima* roots. C-glycosylated flavonoids (orientin, vitexin and isovitexin) and tannin (tannic acid) concentration in *P. mollissima* were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and both irradiance and plant organ affected the concentration of these phenolic compounds. The irradiance provided by 2 LED bulbs increased orientin ( $1.50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and vitexin ( $6.63 \mu\text{g g}^{-1}$ ) concentration in the leaves, 4 LED bulbs increases isovitexin concentration in the roots ( $0.33 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and 2 fluorescent bulbs increased tannic acid concentration in the roots ( $1.99 \mu\text{g g}^{-1}$ ). This constitutes the first report of the effects of irradiance levels over secondary metabolism in *P. mollissima*, thus contributing to prospective works aiming the improvement of phenolic compounds *in vitro* production systems in the species.

## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* engloba mais de 520 espécies, sendo a maioria originária das zonas tropical e subtropical do novo mundo. O gênero compreende várias espécies de consumo *in natura*, uso ornamental e propriedades medicinais como sedativo, antiespasmódica e antibacteriana (Medina et al., 1990; Speroni et al., 1996; Coppens et al., 1997). Aproximadamente 60 espécies são comestíveis, entre elas destacam-se *P. edulis* Sims ('purple passion fruit'), *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener ('passion fruit'), *P. ligularis* Juss ('sweet granadilla'), *P. mollissima* Bailey H.B.K. ('banana passion fruit'), *P. quadrangularis* L. ('giant granadilla') e *P. laurifolia* (Yockteng et al., 2011).

As *Passifloras* silvestres são reservatórios de genes para tolerância ao estresse por fatores bióticos e abióticos, devido às adaptações adquiridas pela ampla distribuição geográfica deste gênero. Pelas características fenotípicas de vigor, rendimento e resistência a doenças as espécies silvestres de *Passiflora* são usadas em programas de melhoramento genético (Yockteng et al., 2011).

Dentre as passifloras, *P. ligularis* e *P. mollissima* representam algumas das espécies promissoras e de interesse atual nos programas de melhoramento de maracujazeiro, assim como em estudos fitoquímicos dado que apresentam ampla variabilidade genética. *P. ligularis* Juss é cultivada desde as montanhas do México na América Central até a América do Sul (FAO, 2012). O fruto é amplamente consumido *in natura* e em bebidas e sorvetes (Dhawan et al., 2004). Por sua vez, *P. mollissima* cresce amplamente na região Andina da América do Sul, onde a polpa é utilizada em geleias, sucos e sorvetes (Simirgiotis et al., 2013). Esta espécie é considerada de importante valor no melhoramento do gênero em função de sua resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae* (Oliveira, 1987).

Dentro da cultura de tecidos *in vitro*, a regeneração via embriogênese somática e a produção de metabólitos secundários representam duas aplicações de significativa relevância. A embriogênese somática em *Passifloras* desempenha papel importante entre as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* dada sua eficiência na regeneração de plantas, na propagação em grande escala e na contribuição para o entendimento dos aspectos fisiológicos e moleculares (Otoni et al., 2013; Rocha e Dornelas, 2013). De outro lado, existe crescente demanda de prospecção de compostos bioativos novos para

fins terapêuticos, dentre outros, sendo necessárias alternativas para potencializar a biossíntese de metabólitos secundários *in vitro* com propriedades conhecidas.

Desde os primeiros relatos de formação de embriões somáticos em *Daucus carota* (Steward et al., 1958) e em *Oenanthe aquatica* por Harry Waris (Krikorian e Simola, 1999) confirmou-se a totipotencialidade das células vegetais (Yang e Zhang, 2010). Nessa via morfogênica uma única célula ou pequenos grupos de células somáticas, mediante a percepção de sinais específicos adquirem a competência embriogênica e formam eixos bipolares, que passam por estádios subsequentes de histodiferenciação, podendo originar uma planta (Fehér et al., 2003; Fehér, 2005; Yang e Zhang, 2010; Rose et al., 2010; Rocha e Dornelas, 2013).

Para algumas espécies do gênero já foram descritos protocolos de embriogênese somática (Otoni, 1995; Anthony et al. 1999; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Paim Pinto et al., 2011; Albino, 2013). Esta via de regeneração demonstra-se mais atraente pelo número expressivo de regenerantes e do menor nível de variação somaclonal (Gaj, 2001; Paim Pinto et al., 2010). No entanto, no gênero *Passiflora*, a menor frequência de regeneração limita a efetiva propagação por esta via (Zerbini et al., 2008).

Durante a embriogênese somática apresenta-se reprogramação da expressão gênica o qual conduz a modificações nos padrões de divisão e diferenciação celular (Fehér et al. 2003). O gene *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) foi isolado pela primeira vez a partir de células embriogênicas de cenoura (Schmidt et al., 1997) como um marcador de células competentes para embriogênese somática (Ma et al., 2012; Steiner et al., 2012). Segundo Savona et al. (2012) genes desta família estão envolvidos na pluripotência celular e estão presentes tanto na programação embriogênica quanto na organogênica. Para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Paim Pinto, 2009) e *P. morifolia* Masters (Albino, 2013) foi investigada a expressão do gene *SERK* durante a embriogênese somática usando a técnica de hibridização *in situ*.

Na atualidade há perspectivas para validar o uso desta via de regeneração para outras espécies do gênero já que é usada como uma ferramenta nos programas de transformação genética (Otoni et al., 2013). Um protocolo de regeneração de embriões somáticos ainda é ausente para *P. ligularis* pelo qual surge a necessidade de realizar estudos que contribuam para o entendimento das condições que induzem a embriogênese somática e a expressão de genes associados a este processo morfogênico.

Outra aplicação da cultura de tecidos *in vitro* é a biossíntese de metabólitos secundários. Recentemente, tem surgido o interesse pelo estudo fitoquímico de *P. mollissima* devido a suas propriedades medicinais (Zucolotto et al., 2012; Simirgiotis et al., 2013). Pelo mesmo motivo, é de importância considerar as condições de cultura *in vitro* apropriadas para obter uma maior biossíntese de compostos bioativos.

Nesse sentido, a luz mostra-se como um fator fundamental na regulação das respostas morfo-fisiológicas das plantas tanto para o crescimento *in vivo* quanto *in vitro*, (Kim et al., 2004; Yano e Fujiwara, 2012). Todavia, as condições luminosas *in vitro* são reduzidas em relação às que ocorrem *ex vitro*. No entanto, os comprimentos de onda da luz fornecida são pouco específicos e poderiam limitar o crescimento *in vitro* das plantas (Kim et al., 2004), pelo qual é necessário determinar os requerimentos luminosos próprios (qualidade e quantidade de luz) de cada espécie vegetal em condição *in vitro* (Hata et al., 2013).

Nas culturas *in vitro* a fonte de luz comumente usada são as lâmpadas fluorescentes brancas (Kim et al., 2004). No entanto, o desenvolvimento de LED (diodo emissor de luz) tornou-se uma fonte promissora para esses ambientes (Yeh e Chung, 2009) apresentando múltiplas vantagens em comparação às lâmpadas tradicionais (Kim et al., 2004; Yeh e Chung, 2009; Fang et al., 2011). O sistema de iluminação com LEDs produz uma alta densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) ou irradiância com comprimentos de onda específicos (Park et al., 2013) suficiente para promover o crescimento de culturas *in vitro* (Kim et al., 2004; Lin et al., 2011). Da mesma forma, a influência da luz na biossíntese de metabólitos secundários (MS) *in vitro* tem sido relatada (Kopsell e Kopsell, 2008). Já foi comprovado que as culturas *in vitro*, a partir de diferentes tipos de explantes ou plantas completas, são capazes de produzir ampla variedade de alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (Bourgand et al., 2001).

Dentre os MS, os compostos polifenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, são mais comumente encontrados nas plantas (Sati et al., 2010). Este tipo de compostos estão associados à atividade antioxidante pela prevenção do estresse oxidativo, causantes de câncer, doenças neuro-degenerativas e cardiovasculares (Chang et al., 2007; Boligon et al., 2012; Marroquín et al., 2012), além de possuir atividade antibacteriana (Marroquín et al., 2012).

Mediante estudos fitoquímicos têm sido encontrados e caracterizados MS no gênero, principalmente, em *P. edulis* e *P. incarnata* (Dhawan et al., 2004; ANVISA, 2010) sendo reportados com maior frequência os flavonoides C-glicosidados

(Abourashed et al., 2002; Dhawan et al., 2004; Zeraik e Yariwake, 2010; Zucolotto et al., 2012) associados com vários efeitos farmacológicos (Sena et al., 2009; Zucolotto et al., 2012). Em geral, os flavonoides estão envolvidos com múltiplas funções biológicas, entre as quais destaca-se a proteção contra radiação UV (Havsteen, 2002). Para *P. mollissima* foi relatada a presença de alguns MS (Froehlich et al., 1989; Dhawan et al., 2004) entre os quais os flavonoides C-glicosilados (Zucolotto et al., 2012; Simirgiotis et al., 2013), porém para compostos fenólicos como os taninos todavia não há um relato para esta espécie.

Contudo, até o presente momento apenas 20-30% das plantas foi investigado quimicamente, sendo que dezenas de MS têm sido isolados e as suas estruturas elucidadas (Harborne e Williams, 2000). Existem trabalhos sobre MS, na sua maioria, usando material vegetal de origem *ex vitro*. O uso de irradiância UV para induzir o aumento da biossíntese de compostos fenólicos *in vitro* foi descrito para *P. quadrangularis* (Antognoni et al., 2007) e *P. morifolia* (Albino, 2013). Assim, é de importância estabelecer quais as mudanças físicas e químicas de vitroplantas de *P. mollissima* submetidas a mudanças no sistema luminoso, com o propósito de determinar as condições estimuladoras da biossíntese de flavonoides e taninos em condições *in vitro*.

Nesse contexto, o presente trabalho apresenta dois capítulos abordando o estudo para *P. ligularis* e *P. mollissima*. Assim, o objetivo do primeiro capítulo foi estabelecer um protocolo eficiente de indução de embriogênese somática *in vitro* a partir de embriões zigóticos maduros e caracterizar o padrão de expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ* durante o processo morfogênico de *Passiflora ligularis* Juss. Para o segundo capítulo objetivou-se determinar a influência da irradiância no crescimento e desenvolvimento, no perfil fitoquímico, no teor de flavonoides C-glicosilados e de ácido tânico de vitroplantas de *Passiflora mollissima* Bailey H.B.K.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abourashed ES, Vanderplank JR, Khan IA (2002) High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology** 40: 81-91.

Albino BES (2013) **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 74p.

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**, Humana Press, pp.169-181.

Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia** 78: 345-352.

ANVISA (2010) **Farmacopeia Brasileira**. 5ed. Brasília. 1448p. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd_farmacopeia/index.htm). Acesso, Setembro de 2013.

Boligon AA, De Brum TF, Frohlich JK, Froeder ALF, Athayde ML (2012) HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. **Research Journal of Phytochemistry** 6: 84-91.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Review: Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161: 839–851.

Chang HC, Huang GJ, Agrawal DC, Kuo CL, Wu CR, Tsay HS (2007) Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as Gusuibu. **Botanical Studies** 48: 397-406.

Coppens EG, Segura SD, Hodson de JE, Góngora G (1997) Les fruits de la passion. In: Charrier A, Jaquot M, Hamon S, Nicolas D (Eds) **L'amélioration des plants tropicaux**. CIRAD-OSTOM Coedition, Montpellier, pp. 291–312.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004) *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology** 94: 1-23.

Fang W, Chen CC, Lee YI, Chang MY (2011) Development of LED lids for tissue culture lighting. **Acta Horticulturae** 907: 397–402.

Fehér A, Pasternak T, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 74: 201-228.

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.

FAO (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponível em: <<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=2381>> e <[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/granadilla.htm#a3](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/granadilla.htm#a3)> Acesso julho de 2013.

Froehlich O, Duque C, Schreier P (1989) Volatile constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 37: 421–425.

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.

Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55: 481-504.

Hata N, Hayashi Y, Ono E, Satake H, Kobayashi A, Muranaka T, Okazawa A (2013) Differences in plant growth and leaf sesamin content of the lignan-rich sesame variety ‘Gomazou’ under continuous light of different wavelengths. **Plant Biotechnology** 30: 1–8.

Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** 96: 67–202.

Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae** 101: 143–151.

Kopsell DA, Kopsell DE (2008) Genetic and environmental factors affecting plant lutein/zeaxanthin. **Agro FOOD Industry Hi Tech** 19: 44–46.

Krikorian AD, Simola LK (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893–1973). **Physiologia Plantarum** 105: 348–355

Lin Y, Li J, Li B, He T, Chun Z (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 329–335.

Ma J, He YH, Wu CH, Liu HP, Hu ZY, Shun GM (2012) Cloning and molecular characterization of a *SERK* gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter** 30: 195-203.

Marroquín MN, Cruz SM, Cáceres A (2012) Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. Proceedings of the International Society on Medicinal and Aromatic Plants – IMAPS 2010 and “History of Mayan Ethnopharmacology” – IMAPS 2011 Eds: J. Ghaemghami et al. **Acta Horticulturae** pp. 93-98.

Medina J, Paladini A, Wolfman C, De Stein M, Calvo D, Díaz L, Pena C (1990) Chrysin. A naturally occurring ligand for ben-zodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. **Biochemical Pharmacology** 40: 2227-2231.

Oliveira JC (1987) Melhoramento genético. In: Ruggiero, C. (Ed.) **Cultura do Maracujazeiro**. Legis Suma, Ribeirão Preto. pp. 218-246.

Otoni WC (1995) **Hibridização e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. 198p.

Otoni WC, Paim Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LC, Tanaka FAO (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House. pp. 1-17.

Paim Pinto DL (2009) **Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* e otimização da transformação genética via SAAT mediante avaliação transiente do gene *GUS* em *Passiflora* spp.** Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. 89 p.

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.

Paim Pinto DL, Almeida AMR, Silva ML, Oliveira EJ, Otoni WC (2011). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) commercial populations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 107: 521-530.

Park SY, Lee JG, Cho HS, Seong ES, Kim HY, Yu CY, Kim JK (2013) Metabolite profiling approach for assessing the effects of colored light-emitting diode lighting on the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer). **Plant Omics Journal** 6: 224-230.

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* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae** 738: 425-431.

Rocha D, Dornelas MC (2013) Review “Molecular overview on plant somatic embryogenesis”. **CAB Reviews** 8, No. 022. In: <http://www.cabi.org/cabreviews>. Acesso julho de 2013.

Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010) **Developmental biology of somatic embryogenesis**. In: Pua EC, Davey MR (eds) Plant developmental biology-biotechnological perspectives. Heidelberg: Springer. Pp. 3-26.

Sati SC, Sati N, Rawat U, Sati OP (2010) Medicinal plants as a source of antioxidants. **Research Journal of Phytochemistry** 4: 213-224.

Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falascal G, Rovere FD, Constantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamur AMM (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany** 63: 471-488.

Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G, Bórquez JE, Kennelly EJ (2013) The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: A source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. **Molecules** 18: 1672-1692.

Silva ML, Paim Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009). A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 99: 47–54.

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development** 124: 2049–2062.

Sena LM, Zucolotto SM, Reginatto FH, Schenkel EP, De Lima TCM (2009) Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* Degener in mice: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine** 234: 976–975.

Speroni E, Billi R, Pellegrino NC, Minghetti A (1996) A role of chrysin in the sedative effects of *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research** 10: 98-100.

Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2012) A gymnosperm homolog of *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 109: 41–50.

Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth of organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany** 45: 704-708.

Yano A, Fujiwara K (2012) Plant lighting system with five wavelength-band light-emitting diodes providing photon flux density and mixing ratio control. **Plant Methods** 8: 1–12.

Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences** 29: 36–57.

Yeh N, Chung JP (2009) High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13: 2175–2180.

Yockteng R, Coppens d’Eeckenbrugge G, Souza-Chies TT (2011). Passifloras. In: **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical fruits**, pp. 129-171.

Zeraik ML, Yariwake JH (2010) Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp. **Microchemical Journal** 96: 86–91.

Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008). Passionfruit. In: Kole C and Hall TC (eds.) **A Compendium of Transgenic Crop Plants**, Tropical and Subtropical Fruit and Nuts. 1st ed. John Wiley & Sons, 5: 213-234.

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP (2012) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis** 23: 232-239.

## CAPITULO I

### **Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e caracterização da expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss.**

#### **RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos para *Passiflora ligularis* e avaliar o padrão de expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ*. Embriões zigóticos maduros foram incubados em meio Murashige e Skoog (MS) com diferentes concentrações de auxinas e citocininas. O meio de cultura suplementado com a combinação de 45,2 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), 2,2 µM de 6-benziladenina (BA) e 2,3 µM de thidiazuron (TDZ) induziu a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos em estágio globular. O teste histoquímico de dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Amostras coletadas aos 5, 15 e 35 dias no meio de indução e 5 dias no meio de maturação foram usados na caracterização do gene *SERK*. A expressão do gene *SERK* nas regiões embriogênicas foi confirmada pela técnica de hibridização *in situ* com sonda heteróloga de *Passiflora cincinnata* *SERK* (*PcSERK*) apresentando um sinal forte aos 5 dias no meio de maturação. O desenvolvimento posterior e germinação dos embriões somáticos não foram observados no meio enriquecido com carvão ativado e sem reguladores de crescimento. Esse estudo constitui o primeiro relato de indução e expressão gênica da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *P. ligularis*.

**Palavras-chave:** Expressão gênica, Morfogênese, Maracujazeiro, Reguladores de crescimento.

**Somatic embryogenesis from zygotic embryos and characterization of *SERK* gene expression in *Passiflora ligularis* Juss.**

**ABSTRACT**

The present study aimed to establish a protocol for induction of somatic embryogenesis from zygotic embryos for *Passiflora ligularis* and show the pattern of *SERK* gene expression by *in situ* hybridization. Mature zygotic embryos were incubated on Murashige and Skoog (MS) at different concentrations of auxin and cytokinins. The medium supplemented with 45.2  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2.2  $\mu\text{M}$  of 6-benzyladenine (BA) and 2.3  $\mu\text{M}$  thidiazuron (TDZ) induced the formation of embryogenic calli and globular stage embryos. The double histochemical staining test with acetic carmine and Evans blue confirmed the embryogenic competence of the material. Samples collected at 5, 15 and 35 days, in the induction medium, and 5 days on maturation medium were used for *in situ* hybridization of *SERK* gene. *SERK* gene expression in embryogenic regions was confirmed by *in situ* hybridization technique with heterologous *Passiflora cincinnata* *SERK* (*PcSERK*) probe, showing a strong signal at five days in the maturation medium. The further development and germination of somatic embryos were not observed in the medium proposed with activated charcoal and without growth regulators. For *P. ligularis* the information from this study represent the first report on the events of gene expression and induction of somatic embryogenesis from zygotic embryos.

**Keywords:** Gene expression, Morphogenesis, Passionfruit, Growth regulators.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) compreende 24 subgêneros e 520 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Garcia et al., 2011; Yockteng et al., 2011; Pacheco et al., 2012), sendo este gênero o maior e mais importante economicamente (Ulmer e MacDougal, 2004). Os usos potenciais das passifloráceas são diversos. Aproximadamente 60 espécies são comestíveis, destacando-se *P. edulis* Sims ('purple passion fruit'), *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener ('passion fruit'), *P. ligularis* Juss ('sweet granadilla'), *P. mollissima* Bailey H.B.K. ('banana passion fruit'), *P. quadrangularis* L. ('giant granadilla') e *P. laurifolia* (Yockteng et al., 2011).

Dentre as passifloras de importância econômica *Passiflora ligularis* Juss tem sido reconhecida por ser cultivada para consumo *in natura* e por suas propriedades medicinais (Dhawan et al., 2004). *P. ligularis* é originária das montanhas dos Andes entre a Bolívia e a Venezuela e comumente conhecida como 'granadilla' (na Bolívia, Costa Rica, Equador, México e Peru); 'granadilla comum' (na Guatemala); 'granadilla da China' ou 'parchita amarilla' (na Venezuela); 'granadilla' (na Jamaica); e 'sweet granadilla' (em países de língua inglesa) (Kannan et al., 2011). Esta é cultivada desde o norte da Argentina até o México e nas montanhas tropicais da África e Austrália, em climas entre 15° e 18°C de temperatura, 600 a 1000 mm de precipitação anual e altitude de 1700 a 2600 metros (FAO, 2012).

Desde os anos 60, existe um número crescente de trabalhos em cultura de tecidos do gênero *Passiflora*, em que a organogênese é o de sistema de regeneração predominante (Vieira e Carneiro, 2004; Vieira et al., 2005; Passos e Bernacci, 2005; Nhut et al., 2007; Zerbini et al., 2008). No entanto, a via morfogênica baseada na embriogênese somática também foi relatada para algumas espécies do gênero como *Passiflora giberti* N. E. Brown (Otoni, 1995; Anthony et al., 1999), *P. cincinnata* Mast. (Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2011), *P. edulis* Deg. (Paim Pinto et al., 2011) e *P. morifolia* (Albino, 2013).

Desde os relatos pioneiros da formação de embriões somáticos em *Oenanthe aquatica* por Harry Waris (Krikorian e Simola, 1999) e em *Daucus carota* (Steward et al., 1958) foi confirmada por esta via morfogênica a totipotencialidade das células vegetais (Yang e Zhang, 2010), assim como a significativa eficiência na regeneração de plantas e propagação em grande escala de culturas comerciais (Silva et al., 2009; Yang e Zhang, 2010). No entanto, no gênero *Passiflora* a menor frequência de regeneração

continua a impedir a efetiva propagação via embriogênese somática (Zerbini et al., 2008).

Na embriogênese somática uma única célula ou pequeno grupo de células somáticas (incluindo células haploides), a partir da percepção de sinais específicos (Rocha e Dornelas, 2013), adquirem a competência para dividir-se e formar estruturas bipolares, que passam por estádios embriogênicos subsequentes, podendo originar uma planta (Jiménez e Bangerth, 2001; Fehér et al., 2003; Fehér, 2005; Namasivayam, 2007; Yang e Zhang, 2010; Rose et al., 2010).

Durante a embriogênese somática apresenta-se reprogramação da expressão gênica o qual conduz a modificações nos padrões de divisão e diferenciação celular, sendo útil no estudo de aspectos morfofisiológicos, celulares e moleculares do processo (Fehér et al., 2003). Na atualidade, o estudo aprofundado da embriogênese somática inclui análises de proteômica e transcriptômica, permitindo isolar e caracterizar os genes marcadores específicos envolvidos e compreender os fatores que influenciam a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos (Rocha e Dornelas, 2013).

Os genes da família *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) codificam para um subgrupo de receptores transmembranas com repetições ricas em leucina, que possuem um domínio quinase intracelular e estão diretamente relacionados com uma série de eventos em nível celular, principalmente na embriogênese somática (Steiner et al., 2012). O gene *SERK* foi isolado pela primeira vez a partir de células embriogênicas de cenoura como um marcador da embriogênese somática (Schmidt et al., 1997). Segundo Savona et al. (2012) genes desta família estão envolvidos na pluripotência celular tanto na programação embriogênica quanto organogênica.

A expressão do gene *SERK* foi usada como um marcador da embriogênese somática ou de células competentes para formar embriões somáticos (Steiner et al., 2012; Ma et al., 2012), em amplo número de espécies *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003), *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2004), *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005), e *Theobroma cacao* (Santos et al., 2005). Também para *P. edulis* (Paim Pinto, 2009) e *P. morifolia* (Albino, 2013) foi investigada a expressão de *SERK* na embriogênese somática.

Para membros do gênero *Passiflora* é indispensável estabelecer e, ou ampliar os protocolos de embriogênese somática baseados nos já existentes para espécies do gênero (Otoni et al., 2013), dado que há perspectivas para validar o uso desta via de regeneração em programas de transformação genética (Shang et al., 2009).

Por ser espécie de amplo consumo *in natura*, *Passiflora ligularis* requer estratégias sustentáveis nas áreas de propagação vegetal e melhoramento genético, visando à produção de material vegetal com características agronômicas desejáveis. Pelo qual surge a necessidade de estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* eficientes, idealmente via embriogênese somática, permitindo assim estudo dos aspectos morfo-fisiológicos e moleculares associados às respostas *in vitro* dessa espécie.

Nesse contexto, o presente trabalho objetiva-se estabelecer um protocolo eficiente de indução de embriogênese somática *in vitro* a partir de embriões zigóticos maduros para *Passiflora ligularis* Juss. e caracterizar o padrão de expressão do gene *SERK* por meio da hibridização *in situ* durante o processo morfogênico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e indução de calos embriogênicos

As sementes utilizadas foram coletadas de frutos maduros de *P. ligularis*, no município de Buenavista (05°39'N 74°19'O), Departamento de Boyacá, Colômbia.

Com auxílio de uma mini-morsa foram retirados os tegumentos das sementes segundo protocolo de Reis et al. (2007). Em seguida, deu-se sua desinfestação em capela de fluxo laminar, acrescentando-se etanol a 70% (v/v) por 1 min, seguido por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com 2 gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v), durante 15 min e, logo após, realizada a tríplice lavagem em água deionizada estéril. Previamente ao isolamento dos embriões zigóticos, as sementes sem tegumentos foram imersas em água deionizada e autoclavada, por 15 h, para reidratar e facilitar a retirada dos embriões.

Na capela de fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi, foram retirados os embriões zigóticos, os quais foram inoculados em meio de indução de embriogênese somática (MIES), constituído por sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, e 0,25% (p/v) de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA). No meio de indução de embriogênese somática para *P. ligularis* diferentes combinações de reguladores de crescimento foram usados em testes preliminares: M1 (45,2 µM de 2,4-D + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ); M2 (2,7 µM de ANA + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ); M3 (40,3 µM de ANA + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ); M4 (2,7 µM de ANA + 31,0 µM de Picloram + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ); M5 (31,0 µM de Picloram + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ) e M6 (45,2 µM de 2,4-D + 26,8 µM de ANA + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ). Todos os meios foram ajustados ao pH 5,7 ± 0,1 e autoclavados por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm de pressão.

As culturas foram estabelecidas em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo alíquotas de 15 mL de meio, e mantidas na sala de crescimento em ausência de luz, durante a fase de indução de embriogênese somática (Silva et al., 2009). A avaliação foi conduzida ao trigésimo dia após a inoculação dos embriões zigóticos.

### **2.1.1 Avaliações e análises estatísticas**

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e dez repetições, cada parcela constituída por uma placa com cinco embriões. As mudanças nos embriões zigóticos foram quantificadas no dia 30 após inoculação no meio de indução mediante a porcentagem de calo embriogênico.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação entre médias. A análise estatística foi realizada no utilizando o programa Genes (Cruz, 2006).

### **2.2 Meio de maturação dos embriões somáticos**

Após esse período, os explantes obtidos foram transferidos para o meio de maturação (MM) 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.

Em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal de 90 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) foram vertidos 25 a 30 mL de meio e os calos foram transferidos. As placas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil). Nessa fase, a cultura foi colocada na sala de crescimento e mantida a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz, irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). As avaliações realizaram-se a cada cinco dias quantificando-se a presença ou ausência de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar).

### **2.3 Caracterização anatômica e teste histoquímico**

Para a caracterização anatômica foi usado o meio M1 (45,2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 2,2  $\mu\text{M}$  de BA + 2,3  $\mu\text{M}$  de TDZ) e para o teste histoquímico todos os meios de indução de embriogênese somática.

#### **2.3.1 Microscopia de luz**

Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos foram coletados dois explantes do embrião zigótico no dia 35 dias após indução. As amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky modificado [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). Posteriormente foram desidratadas em série etílica crescente, incluídas em resina metacrilato (Historesina, Leica®) e emblocadas em moldes plásticos. Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica) e os cortes de 5 µm de espessura foram aderidos em lâminas histológicas, e corados com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981), com pH ácido (4,0). Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina sintética Permound.

### **2.3.2 Teste Histoquímico**

Para a identificação de calos embriogênicos e não-embriogênicos na fase de indução de embriogênese somática, foram utilizados os corantes azul de Evans (0,5%) seguido por carmin acético (1%), cada um por 3 min (Durzan, 1998). Logo após o material foi colocado em lâminas histológicas e realizadas as observações e registros fotográficos no estereomicroscópio (Olympus SZH e microscópio Olympus AX70, com sistema U-Photo).

## **2.4 Análise da expressão do gene *SERK* de *P. ligularis* por hibridização *in situ***

Para a caracterização da hibridização *in situ* foi usado o meio M1 (45,2 µM de 2,4-D + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ).

### **2.4.1 Coleta e preparo dos tecidos**

Para avaliar a expressão do gene *SERK*, sob condições livres da ação de RNAses, foram coletadas amostras aos 5, 15, 35 dias após indução e 5 dias no meio de maturação. As amostras foram imersas em paraformaldeído 4 % (p/v) 'overnight', sendo posteriormente desidratadas em séries etanólicas e armazenadas em etanol absoluto. Ao longo das etapas de processamento as amostras foram mantidas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em solução de etanol: xilol (3:1, 1:1, 1:3), à cada 4 h, seguidas de xilol (100 %) por 8 h. As amostras foram então transferidas para estufa a 65°C e gradativamente infiltradas com parafina (2-3 dias). Logo depois, as amostras foram emblocadas em parafina em moldes de papel.

### 2.4.2 Síntese da sonda marcada com digoxigenina

Uma sonda heteróloga ‘antisense’ foi sintetizada utilizando como molde uma sequência parcial de 557 pb do gene *SERK* de *Passiflora cincinnata* (*PcSERK*). O fragmento previamente clonado codifica uma região conservada que se estende do domínio SPP até parte do domínio kinase. A sonda foi marcada com digoxigenina (DIG-UTP), utilizando-se o “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche Applied Science), segundo recomendações do fabricante.

### 2.4.3 Reação de hibridização

Durante a fase de pré-hibridização, cortes histológicos longitudinais (10 µm) de calos embriogênicos fixados em lâminas RNase ‘free’ foram tratados com proteinase K (1 µg mL<sup>-1</sup> em 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5) por 5 min a 37 °C e, posteriormente, lavadas duas vezes em água tratada com DEPC, à temperatura ambiente.

Para a hibridização *in situ*, foram utilizados 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL<sup>®</sup>) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 min e adicionados a 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X). Em seguida, para a hibridização, 100 µL de solução de hibridização foram colocados sobre os cortes em cada lâmina e cobertas com Parafilm<sup>®</sup>. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 16 h.

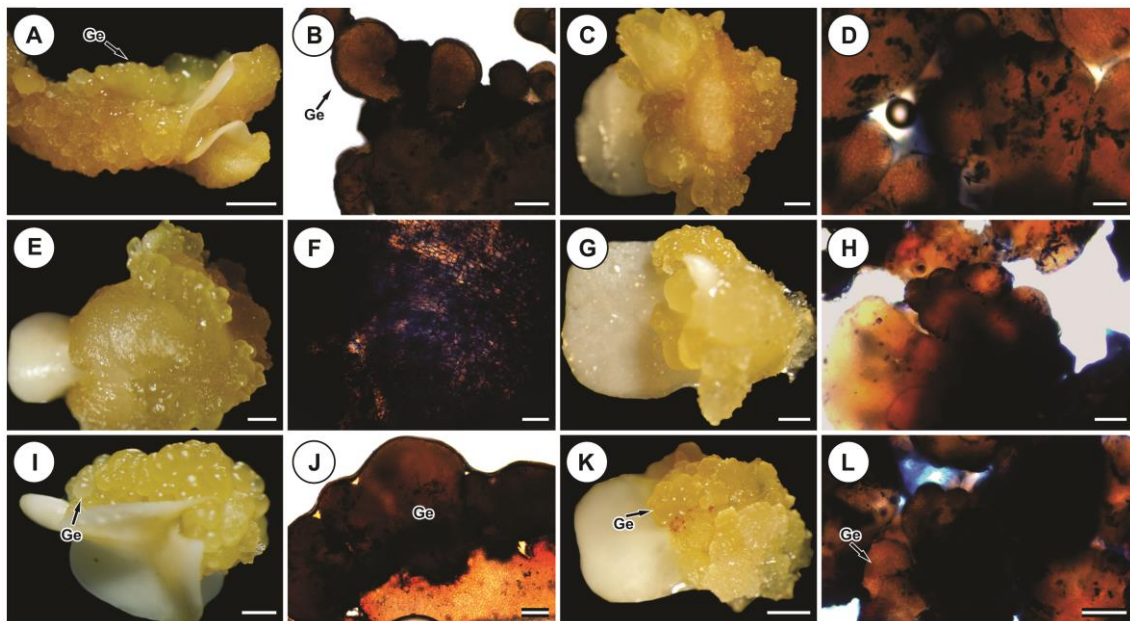
Após a hibridização as lâminas foram lavadas, por 20 min em cada solução SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X, preparadas a partir de uma solução SSC 20X composta por NaCl 3M, Na<sub>3</sub>-citrato 0,3M, pH 7,2. Em seguida foram mantidas por 5 min em tampão de detecção 1 (TDI; 0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 min em tampão de bloqueamento. As lâminas foram novamente lavadas em TDI por 5 min e incubadas durante 1 h com anticorpo Anti-Digoxigenina AP Fab Fragments (Roche<sup>®</sup>) diluído 1:1000 em TDI. Após a sequência de duas lavagens, de 15 min cada, em TDI e uma lavagem de 5 min em tampão de detecção 3 (TDIII; 0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) e 4,5 µL de NBT (nitroblue tetrazólio) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) em 1 mL de TDIII por 45 min, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (TDIV 0,01 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 min, e as lâminas montadas em água.

A captura das imagens foi realizada em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic Instruments Inc., Spot Issightcolous 3.2.0, EUA) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

### 3. RESULTADOS

Constatou-se a indução de embriogênese somática indireta em *Passiflora ligularis* Juss. a partir de embriões zigóticos maduros (Figura 1) e a expressão do gene *SERK* com diferente intensidade no sinal de hibridização *in situ* ao longo do processo morfogênico (Figura 3).

A embriogênese somática indireta foi observada a partir do 15º dia de cultura dos embriões zigóticos, a qual apresentou a formação de calo principalmente nos cotilédones e nas regiões próximas à radícula. Foi evidenciada a presença de calo embriogênico principalmente em duas áreas do explante, no eixo embrionário (Figuras 1C, 1E, 1G, 1K) e nos cotilédones (Figuras 1A, 1I). A aparência do calo em cada uma dessas áreas foi do tipo friável e de branco a translúcido, e do tipo compacto e translúcido a amarelo, respectivamente.

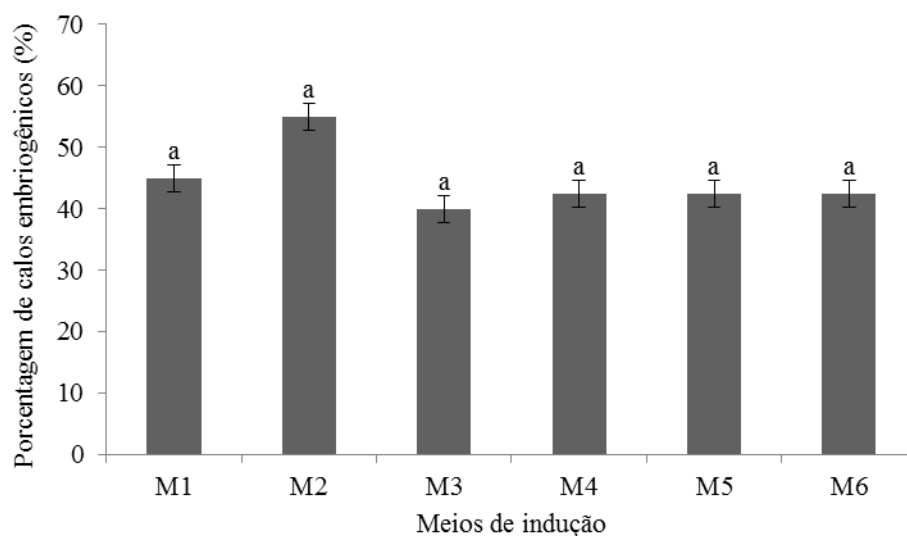


**Figura 1.** Padrões de desenvolvimento de calo embriogênico e embriões somáticos no estágio globular aos 30 dias de cultivo nos meios de indução de embriogênese somática de *Passiflora ligularis* Juss. Meios de cultura (M) suplementados com diferentes concentrações de auxinas e citocininas. Desenvolvimento de regiões embriogênicas no embrião zigótico cultivado no meio de indução M1 (A), M2 (C), M3 (E), M4 (G), M5 (I), e M6 (K) (Barra = 500 µm). Resposta ao teste de azul de Evans e carmim acético pela presença de células embriogênicas (vermelho) e não embriogênicas (azul escuro) nos explantes cultivados nos meios de indução: M1 (B), M2 (D), M3 (F), M4 (H), M5 (J), e M6 (L). Abreviatura: Ge: embrião globular (Barra = 200 µm).

No 30º dia de cultura, observou-se o desenvolvimento de calos embriogênicos e não-embriogênicos nos meios de cultura propostos. Nos meios de indução de embriogênese somática (MIES), com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, M1 (2,4-D + BA + TDZ), M2 (ANA + BA + TDZ), M4 (Picloram + ANA + BA + TDZ), M5 (Picloram + BA + TDZ) e M6 (2,4-D + ANA + BA + TDZ), foram constatadas a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos no estágio globular (Figura 1A-L). O M3 contendo uma combinação de 2,4-D, BA e TDZ induziu a presença de calos não-embriogênicos (Figura 1E) e pequenos e limitados setores de calos com resposta positiva para o teste de dupla coloração (Figura 1F).

No entanto, o M1 (contendo 45,2 µM de 2,4-D + 2,2 µM de BA + 2,3 µM de TDZ) foi caracterizado por induzir formação de calo embriogênico e embriões somáticos no estágio globular sobre nos cotilédones e eixos embrionários (Figura 1A). Os explantes nos meios de indução M1 (Figura 1B), M2 (Figura 1D), M4 (Figura 1H), M5 (Figura 1J) e M6 (Figura 1L) responderam positivamente ao teste histoquímico de dupla coloração já que os calos embriogênicos e embriões somáticos no estágio globular foram intensamente corados de vermelho, indicando a presença de células com competência embriogênica.

Na porcentagem de formação de calo embriogênico nos meios de indução não houve diferença estatística significativa, apesar de que os valores oscilaram entre 42,5 e 55%. Aos 30 dias após inoculação foi observado que o M2 apresentou uma porcentagem de 55% (Figura 2), porém no meio de maturação o calo que inicialmente era embriogênico apresentou forte tendência de organogênese (dados não mostrados). O M1, com 45% de formação de calo embriogênico (Figura 2), foi considerado para realizar o seguimento dado que a formulação do meio e padrão de desenvolvimento no explante foram similares à resposta de passifloras já descritas.



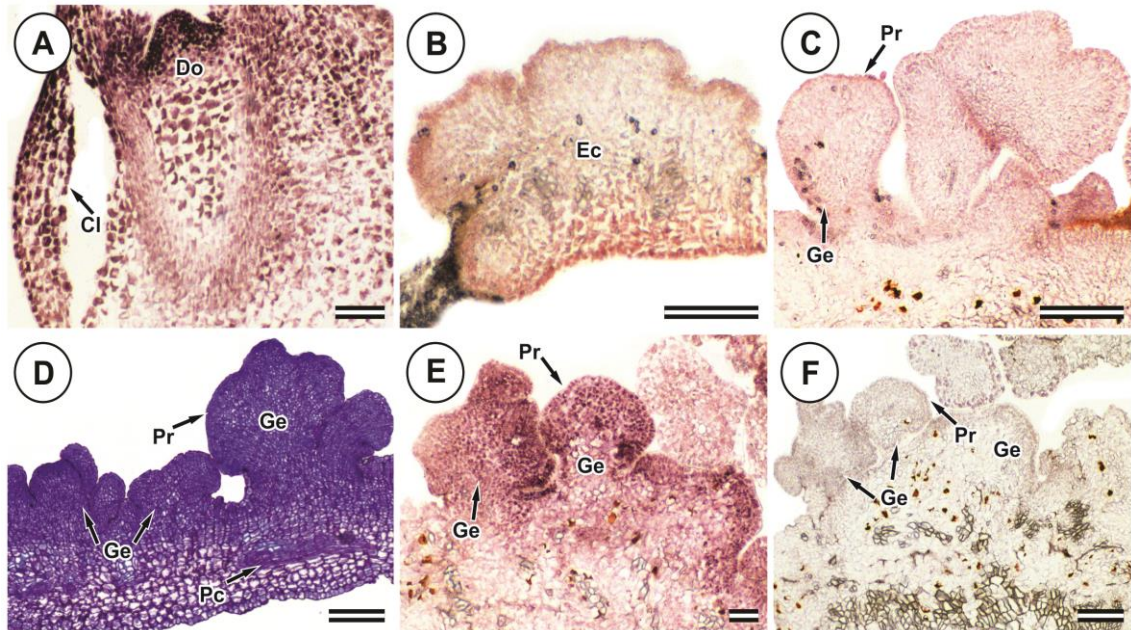
**Figura 2.** Valores médios (%) de formação de calos embriogênicos a partir da cultura de embriões zigóticos maduros de *Passiflora ligularis* Juss. aos 30 dias após incubação no meio de indução de embriogênese somática. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

Na hibridização *in situ*, utilizando a sonda heteróloga desenvolvida para *P. cincinnata* (*PcSERK*), foi constatada a expressão do gene *SERK* nos calos embriogênicos provenientes das fases de indução do M1 (dia 5, 15 e 35) e início da fase de maturação (dia 5 no meio de maturação) da cultura embriogênica (Figura 3).

A hibridização *in situ* indicou que o gene *SERK* é expresso no embrião zigótico de *P. ligularis* na região cotiledonar após 5 dias de incubação no meio de indução (Figura 3A). O sinal foi perceptível nas células da região meristemática (domo do meristema apical caulinar) e células próximas à periferia do cotilédone aos 5 dias de incubação no meio de indução (Figura 3A). Aos 15 dias de cultivo dos embriões zigóticos os múltiplos eventos de proliferação celular e diferenciação promoveram a embriogênese somática indireta com o início da formação de calo no eixo embrionário e nos cotilédones, os calos encontrados foram de tipo friável e, ou compacto. O sinal de hibridização *in situ* do *SERK* foi observado no calo embriogênico nas células associadas à protoderme (Figura 3B). Após 35 dias de cultivo no meio de indução, pode-se observar reduzida expressão do gene *SERK* nos embriões somáticos globulares (Figura 3C).

Após 35 dias no meio de indução e transferidos por cinco dias ao meio de maturação, os embriões somáticos apresentaram protoderme definida e ausência de conexão vascular, observando-se na região do procâmbio do embrião zigótico (Figura 3D). Também, constatou-se que o padrão de expressão do gene intensificou-se logo

após a transferência da cultura ao meio de maturação, sendo evidenciado forte sinal de hibridização do gene *SERK*, quando utilizado a sonda heteróloga *PcSERK* (Figura 3E) e contrastando-se com a sonda controle ‘sense-T7’, em que, como esperado, não houve sinal de hibridização (Figura 3F).



**Figura 3.** Caracterização da expressão do gene *SERK* por meio da hibridização *in situ* com a sonda heteróloga antisense (SP6) e senso (T7) do gene *pcSERK* durante a embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos de *Passiflora ligularis* Juss. (A) Embrião zigótico após cinco dias de inoculação em meio de indução de embriogênese somáticas células do domo apical e periferia do cotilédone. (B) Formação de calos embriogênicos, após 15 dias de incubação no meio de cultura, a protoderme acompanhada pelo sinal de hibridização *in situ*. (C) Embriões globulares, após 35 dias de incubação no meio de indução com sinal de hibridização na região da protoderme. (D-F) Calos embriogênicos com 35 dias em meio de indução e cinco dias em meio de maturação dos embriões somáticos. (D) Seção longitudinal corada com azul de Toluidina. Corte histológico demonstrando a organização celular dos calos embriogênicos com presença de embriões globulares com protoderme definida sem conexão vascular com o tecido de origem. (E) Presença de calo embriogênico e embriões somáticos no estágio globular com expressão forte do sinal do gene *SERK* (F) Corte histológico de calo embriogênico e embriões somáticos no estágio globular com ausência de sinal de hibridização *in situ* com a sonda sense (controle T7). Abreviaturas: Do, domo do meristema apical do embrião zigótico; Cl, folha cotiledonar; Ec, calo embriogênico; Pr, protoderme; Ge, embrião globular; Pc, procâmbio. (Barra = 200 µm).

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo representam o primeiro relato de embriogênese somática indireta a partir de embriões zigóticos e expressão gênica para *Passiflora ligularis* Juss. Mediante técnicas histoquímicas e moleculares foi confirmado e visualizado o desenvolvimento de calos embriogênicos e embriões somáticos em estágio globular.

A formação de embriões globulares em *P. ligularis* ocorreu a partir do dia 30 da incubação no meio de indução contendo diferentes combinações de 2,4-D, 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). A formação de calo tem sido uma característica da embriogênese somática indireta para *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011) e *P. cincinnata* (Silva et al., 2009) usando o mesmo tipo de explante que para *P. ligularis* e meios de cultura suplementados com 2,4-D e BA na fase de indução. De maneira similar que em *P. ligularis*, em essas *Passifloras* o desenvolvimento de calos embriogênicos foi localizado nos cotilédones e nas regiões próximas à radícula.

Após da aplicação de reguladores de crescimento de maneira isolada no meio de indução para *P. ligularis* foi encontrada uma resposta negativa (dados não mostrados), pelo qual, posteriormente foram avaliadas diferentes combinações de auxinas e citocininas com o fim de induzir a formação de calo embriogênico. Tem sido descrito por alguns autores que a aplicação combinada destes reguladores de crescimento nos meios de cultura *in vitro* está associada à morfogênese (Nolan et al., 2003; Beveridge et al., 2007; Wang et al., 2011; Ma et al., 2012; Suprasanna et al., 2013). Especificamente na embriogênese somática, um sinal hormonal, exógeno ou endógeno, é necessário para iniciar a embriogênese, principalmente a combinação de auxinas e citocininas em diferentes concentrações (Ikeda-Iwai et al., 2003; Su et al., 2009).

Particularmente, as auxinas são consideradas um fator importante na indução e regulação da embriogênese somática na iniciação da programação celular (Fehér et al., 2003; Raghavan, 2004; Fehér, 2005; Silva et al., 2009). A auxina é especialmente envolvida com a instalação da polaridade zigótica e, conseqüentemente, com o controle dos genes relacionados ao eixo apical – basal do embrião (Dettmer e Friml, 2011). As citocininas possuem papel essencial no controle da divisão celular e na regulação da síntese de proteínas para a formação de fibras do fuso mitótico (Jelenska et al., 2000). Baixos níveis de auxinas têm sido associados com a maior estabilidade genética em *Passifloras* regeneradas por esta via (Paim Pinto et al., 2010; Paim Pinto et al., 2011);

para *P. ligularis*, concentrações elevadas de auxinas induziram a formação de calos embriogênicos (M1, M3, M4, M5 e M6).

Na morfogênese *in vitro* a calogênese pode resultar nas duas vias de regeneração, organogênese adventícia e embriogênese somática; porém torna-se indispensável identificar a competência embriogênica das células. A resposta dos calos de *P. ligularis* foi positiva no teste de dupla coloração com azul de Evans e carmim acético (Durzan, 1998), marcando as zonas embriogênicas e não-embriogênicas. Essa técnica tem sido usada em trabalhos com *Passiflora* (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Albino, 2013) e outras espécies como *Araucaria angustifolia* (Durzan, 1998; Steiner et al., 2012) e *Pinus pinaster* Ait. (Humánez et al., 2012).

A fase de indução é requerida exatamente para a aquisição da competência embriogênica das células somáticas dos explantes, que em sua maioria, não são embriogênicas (Dodeman et al., 1997). No embrião zigótico, os cotilédones possivelmente possuem células ou conjunto de células com características meristemáticas de identidade semelhante ao periciclo (Sugimoto et al., 2011), que adquirem a competência embriogênica. As etapas iniciais da embriogênese somática são consideradas críticas, pelo estabelecimento da polaridade, da camada protodérmica e dos demais meristemas (Bozhkov et al., 2002). Além disso, a frequência de indução depende das condições de cultivo e dos tecidos utilizados, do genótipo, composição do meio de cultivo *in vitro* (Chalupa, 1999; Snyman et al., 2006) e também dos níveis hormonais endógenos nos explantes (Jiménez e Bangerth, 2001).

Ao longo da indução da embriogênese somática de *P. ligularis*, evidenciou-se que a dinâmica da expressão do gene *SERK* está relacionada temporalmente com a formação e desenvolvimento de calo embriogênico na periferia dos cotilédones do embrião zigótico (Figuras 1 e 3). A expressão do gene *SERK* na embriogênese somática tem sido confirmada para *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) na cultura embriogênica: calos embriogênicos na parte basal do embrião somático primário, fora das camadas celulares do cotilédone do embrião somático primário (formando embrião somático secundário) (Salaj et al., 2008). Assim mesmo, em outras espécies como *Dactylis glomerata* a expressão de *SERK* em culturas embriogênicas já foi relatada (Somleva et al., 2000).

Mediante a técnica de hibridização *in situ* foi constatada a expressão do gene *SERK* com a sonda heteróloga *PcSERK* como um gene marcador de células competentes para embriogênese somática de *P. ligularis*, sendo este resultado constatado também

para *P. cincinnata* (Paim Pinto, 2009) e *P. morifolia* (Albino, 2013). Especificamente o sinal de expressão do gene *SERK* é produto da formação de um precipitado de coloração vermelho escuro a roxo, insolúvel em água, dado pela reação de oxido-redução entre os substratos BCIP/NBT e a fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo anti-DIG o qual foi observado nos calos embriogênicos de *P. ligularis*.

As técnicas de clonagem gênica e marcadores moleculares podem ser aplicados para o entendimento molecular dos processos de desenvolvimento na morfogênese *in vitro* de plantas (Meng et al., 2010; Savona et al. 2012; Rocha e Dornelas, 2013). O padrão de expressão gênica na embriogênese somática e zigótica são semelhantes, qualificando a embriogênese somática como um modelo efetivo para estudos de aspectos fisiológicos (Zimmerman, 1993) e moleculares envolvidos na diferenciação celular e regulação do desenvolvimento do embrião (Rocha e Dornelas, 2013). Cabe mencionar que os genes da família *SERK* apresentam um padrão de expressão diferente na embriogênese zigótica e na embriogênese somática, sugerindo funções adicionais para este gene (Santos e Aragão, 2009). Pelo anterior surge a importância de conhecer os fatores que levam a induzir a embriogênese somática, contribuindo também para o aumento da eficiência em protocolos de transformação genética do gênero *Passiflora* (Silva et al., 2009).

Diversos estudos confirmam o papel do *SERK* na embriogênese somática e sugere uma ampla faixa de funções na resposta de plantas a estímulos bióticos e abióticos (Santos e Aragão, 2009). Assim mesmo, durante a embriogênese somática, as mudanças bioquímicas e morfológicas que ocorrem nos explantes sugerem que estão em decorrência da expressão do *SERK* (Albrecht et al., 2008; Santos e Aragão, 2009; Rocha e Dornelas, 2013). O anterior está fortemente relacionado à elicitação de auxinas, principalmente 2,4-D, já que durante a expressão do gene *SERK* estas promovem o estresse oxidativo e a ativação das vias de sinalização hormonal que induzem a embriogênese somática (Santos e Aragão, 2009).

Um avanço nas contribuições na fase de indução da embriogênese somática de *P. ligularis* foi alcançado, assim como um acompanhamento durante essa fase da expressão do gene *SERK*. Ainda será necessário continuar na busca da continuidade do desenvolvimento dos calos embriogênicos e da histodiferenciação dos embriões somáticos, com a germinação dos mesmos, a qual não foi atingida nas condições experimentadas usadas. Com este trabalho ampliaram-se as perspectivas para realizar o acompanhamento das mudanças morfoanatômicas, histológicas e moleculares da

embriogênese somática assim como o isolamento e clonagem do gene *SERK* dos embriões somáticos de *P. ligularis*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albino BES (2013) **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 74p.
- Albrecht C, Russinova E, Kemmerling B, Kwaaitaal M, De Vries SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. **Plant Physiology** 148: 611-619.
- 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**, Humana Press, pp.169-181.
- Beveridge CA, Mathesius U, Rose RJ, Gresshoff PM (2007) Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 44-51.
- Bozhkov PV, Filonova LH, Von Arnold S (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and Bioengineering** 77: 658-667.
- Chalupa V (1999) Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: **Somatic embryogenesis in woody plants** (S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 5: 31-43.
- Cruz CD (2006) Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística. Disponível em: [www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm). Acesso agosto de 2013.
- Dettmer J, Friml J (2011) Cell polarity in plants: when two do the same, it is not the same. **Current Opinion in Cell Biology** 23: 1-11.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004) *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology** 94: 1-23.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany** 48: 1493-1509.
- Durzan DJ (1998) **Process control in somatic polyembryogenesis**. In: Hällgren J.E. (ed.), Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish Proceedings, Swedish University of Agricultural Science 8: 147.

FAO (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). In: <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=2381>  
[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/granadilla.htm#a3](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/granadilla.htm#a3). Acesso julho de 2013.

Fehér A, Pasternak T, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 74: 201-228.

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.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** 50: 151-158.

Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E (2011) Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 106: 47–54.

Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology** 127: 803–816.

Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012) Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 111: 373-383.

Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 34: 107–114.

Jelenska J, Deckert J, Kondorosi E, Legocki AB (2000) Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. **Plant Science** 150: 29-39.

Jiménez VM, Bangerth F (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum** 111: 389–95.

Kannan B, Parimala D, Jayakar B (2011) Antibacterial activity of *Passiflora ligularis* S. **International Journal of Chemical Sciences** 9: 393-396.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137A-138A.

Krikorian AD, Simola LK (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893–1973). **Physiologia Plantarum** 105: 348–355

- Ma J, He YH, Wu CH, Liu HP, Hu ZY, Shun GM (2012) Cloning and molecular characterization of a *SERK* gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus*. cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter** 30: 195-203.
- Meng L, Zhang S, Lemaux PG (2010) Toward molecular understanding of *in vitro* in plant shoot organogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences** 29: 108-122.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90: 1-8.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology** 133: 218-230.
- Nhut DT, Khiet BLT, Thi NN, Thuy DTT, Duy N, Hai NT, Huyen PX (2007) High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) technology. In: Jain SM, Häggman H (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer, pp. 417-426.
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: **Termarcaphi Pty**. 357p.
- Otoni WC (1995) **Hibridização e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. 198p.
- Otoni WC, Paim Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LC, Tanaka FAO (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House. pp. 1-17.
- Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae** 144: 42-47.
- Paim Pinto DL (2009) **Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* e otimização da transformação genética via SAAT mediante avaliação transiente do gene *GUS* em *Passiflora* spp.** Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. 89 p.
- 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.

- Paim Pinto DL, Almeida AMR, Silva ML, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) commercial populations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 107: 521-530.
- Passos IRS, Bernacci LC (2005) Cultura de tecidos aplicada à manutenção do germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* sp.). Em: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, pp. 361-383.
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of Arabidopsis: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. **American Journal of Botany** 91: 1743-1756.
- 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* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae** 738: 425-431.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma** 249: 747-753.
- Rocha DI, Dornelas MC (2013) Review - Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews** 8, No. 022. In: <http://www.cabi.org/cabreviews>.
- Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010) Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua EC, Davey MR (eds) **Plant developmental biology-biotechnological perspectives**. Heidelberg: Springer. pp 3-26.
- Salaj J, Von Recklinghausen IR, Hecht V, De Vries SC, Schel JH, Van Lammeren AA. (2008) *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology & Biochemistry** 46: 709-714.
- Santa-Catarina C, Hanai LR, Dornelas MC, Viana AM, Floh EIS (2004) *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 79: 53-61.
- Santos MO, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias BBA, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science** 168: 723-729.
- Santos OM, Aragão JLF (2009) Role of *SERK* genes in plant environmental response. **Plant Signaling & Behavior** 4: 1111-1113.
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Rovere FD, Costantino P, et al. (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany** 63: 471-88.

- 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.
- Shimada T, Hirabayashi T, Endo T, Fujii H, Kita M, Omura M (2005) Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (*CitSERK1*) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae** 103: 233–238.
- Silva ML, Paim Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 99: 47–54.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development** 124: 2049–2062.
- Somleva MN, Schimidt EDL, De Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Reports** 19: 718-726.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth of organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany** 45: 704-708.
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2012) A gymnosperm homolog of somatic embryogenesis receptor-like kinase-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue Organ Culture** 109: 41–50.
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. **The Plant Journal** 59: 448–460
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology** 21: 212-218.
- Suprasanna P, Sidha M (2013) Somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House. pp 188-200.
- Snyman S, Meyer G, Richards J, Haricharan N, Ramgareeb S, Hockett B (2006) Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports** 25: 1016-1023.

Ulmer T, MacDougal JM (2004) **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press, Inc. 430 p.

Vieira MLC, Carneiro MS (2004) *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz RE (ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. CABI Publishing, pp. 435- 453.

Vieira MLC, Oliveira EJ, Matta FP, Pádua JG, Monteiro M (2005) Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do Maracujá. Em: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, pp. 411-453.

Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences** 29: 36–57.

Yockteng R, Coppens d'Eeckenbrugge G, Souza-Chies TT (2011). Passifloras. In: **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical fruits**, 129-171.

Wang XD, Nolan KE, Irwanto RR, Sheahan MB, Rose RJ (2011) Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany** 107: 599-609.

Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Passionfruit. In: Kole C and Hall TC (eds.) **A Compendium of Transgenic Crop Plants**, Tropical and Subtropical Fruit and Nuts. 1st ed. John Wiley & Sons, 5: 213-234.

Zimmerman LYNN (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell** 5: 1411-1423.

## CAPÍTULO II

### **Influência da irradiância *in vitro* no desenvolvimento, perfil fitoquímico e teor de flavonoides e taninos em *Passiflora mollissima* Bailey H.B.K.**

#### **RESUMO**

Diversas espécies de *Passiflora* apresentam propriedades farmacológicas importantes associadas à atividade antioxidante de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da irradiância no desenvolvimento vegetal e metabolismo secundário de vitroplantas de *Passiflora mollissima*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram três níveis de irradiâncias fornecidos por lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) e fluorescentes (LF): 2LED ( $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 4LED ( $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 2LF ( $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Observou-se que as variáveis: porcentagem de germinação, comprimento de caule e raiz, e massa fresca e seca, analisadas no crescimento e desenvolvimento das vitroplantas, responderam de maneira diferenciada aos níveis de irradiância, enquanto que na densidade estomática apresentaram-se valores superiores nos tratamentos com LEDs. Pela Cromatografia de Camada Delgada observou-se a presença de taninos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides, e a ausência de cumarinas, compostos antracênicos e alcaloides nos extratos de folhas, caules e raízes de *P. mollissima* nos tratamentos testados. Segundo a análise histoquímica, os taninos aloca-se principalmente nas raízes de *P. mollissima*. A concentração de flavonoides C-glicosilados (orientina, vitexina e isovitexina) e tanino (ácido tânico) foram detectados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nos extratos metanólicos, constatando-se que a irradiância e o tipo de órgão estão relacionados no teor destes compostos fenólicos. A irradiância fornecida por 2LED favoreceu aumento na concentração de orientina ( $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e vitexina ( $6,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ) nas folhas, 4LED de isovitexina na raiz ( $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e 2LF de ácido tânico na raiz ( $1,99 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Para *P. mollissima* esse é o primeiro relato da influência da irradiância no metabolismo secundário, o que contribui à realização de futuros trabalhos e aprimoramento dos sistemas de produção de compostos fenólicos *in vitro* a partir dessa espécie.

**Palavras chaves:** Passifloraceae, Qualidade da luz, Compostos fitoquímicos, Biossíntese, Fenólicos.

## **Influence of irradiance *in vitro* in development, phytochemical profile and flavonoids and tannins contents in *Passiflora mollissima* Bailey H.B.K.**

### **ABSTRACT**

Several species of *Passiflora* exhibit valuable pharmacological properties associated with antioxidant activity given by different secondary metabolites, especially phenolic compounds. The main objective of this study was to determine the influence of irradiance on the plant development, phytochemical profile and biosynthesis of flavonoids and tannins of *Passiflora mollissima* vitroplants. The experiment was conducted in a completely randomized design with three treatments with six replications. Treatments were three levels of irradiance provided by two types of lamps, light emitting diode (LED) and fluorescent (LF): 2LED ( $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 4LED ( $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 2LF ( $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). During the experiment was observed that the variables, percentage of germination, stem length and root fresh and dry weight, evaluated in the analysis of growth and development *in vitro* responded differentially to irradiance used. While higher values in the stomatal density were found in the treatments with LEDs. By Thin Layer Chromatography means, extracts of leaves, stem and roots showed of *P. mollissima* tannins, terpenoids, steroids, saponins and flavonoids, and so contrary to the absence of coumarins, alkaloids and compounds antracenic. According to histochemical tannins allocate mainly on roots of *P. mollissima*. The concentration of C - glycosylated flavonoids (orientin, vitexin and isovitexin) and tannins (tannic acid) were determined by High Performance Liquid Chromatography in methanol extracts, showing that the irradiance level and organ type are related to the concentration of these phenolic compounds. The irradiance provided with 2LED favored the concentration of orientin ( $1.50 \text{ mg g}^{-1}$ ) and vitexin ( $6.63 \text{ mg g}^{-1}$ ) in the leaves, whereas in roots 4LED promoted the accumulation of isovitexin ( $0.33 \text{ mg g}^{-1}$ ) and 2LF of tannic acid ( $1.99 \text{ mg g}^{-1}$ ). This study demonstrated that the synthesis of secondary metabolites can be stimulated by light in *in vitro* conditions. For *P. mollissima* this is the first report on the influence of irradiance in the secondary metabolism, which contributes to the realization of future work directed towards improving the *in vitro* production of phenolic compounds from this species.

**Keywords:** Light quality, Passifloraceae, Phytochemicals, Biosynthesis, Phenolics.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é bem conhecido devido ao sabor agradável dos frutos, propriedades farmacêuticas e flores ornamentais. Além disso, constituem importante fonte de diversidade genética inexplorada nos programas de melhoramento de espécies cultivadas e na introdução de novos cultivares (Yockteng et al., 2011). Em vários estudos do gênero têm sido reportados a extração de compostos bioativos para a indústria farmacêutica pelos efeitos sedativos, antioxidante (Valente et al., 2011), antiespasmódicos, antibacterianos (Dhawan et al., 2004; Kannan et al., 2011), além das propriedades inseticidas (Fajardo et al., 1998; Falguera et al., 2012).

Os frutos das *Passifloras* são reconhecidos por seu alto valor nutricional e conteúdo de vitaminas A e C (Simiriotis et al., 2013). Aproximadamente 60 espécies são comestíveis, entre elas destacam-se *P. edulis* Sims ('purple passion fruit'), *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener (passion fruit), *P. ligularis* Juss ('sweet granadilla'), *P. mollissima* Bailey H.B.K. ('banana passion fruit'), *P. quadrangularis* L. ('giant granadilla') e *P. laurifolia* (Yockteng et al., 2011).

*Passiflora mollissima* cresce amplamente na região Andina da América do Sul, seus frutos apresentam um sabor mais adstringente e menos azedo que outras *Passifloras* (Simiriotis et al., 2013). Na Colômbia, *P. mollissima* é amplamente usada na preparação de sucos, além de preparações fito-farmacêuticas para fins sedativos e hipnóticos (Invima, 2005; Zucolotto et al., 2012).

Tanto para o crescimento *in vivo* quanto *in vitro*, a luz desempenha importante papel na regulação das respostas morfo-fisiológicas das plantas (Kim et al., 2004; Yano e Fujiwara, 2012). Entretanto, as respostas aos comprimentos de onda diferem entre espécies e cultivares (Hamamoto et al., 2003), pelo qual sugere-se a realização de estudos do efeito da luz sobre espécies de interesse (Hata et al., 2013).

Todavia, tipicamente nas condições *in vitro* a quantidade e qualidade de luz dos sistemas luminosos são considerados sub-ótimos em relação às ocorrentes *ex vitro* (Kim et al., 2004). Nessa condição, são usadas lâmpadas fluorescentes como fonte de luz, lâmpadas de iodetos metálicos, sódio de alta pressão e lâmpadas incandescentes para aumentar o nível de fluxo de fótons fotossintéticos. No entanto, essas fontes contêm comprimentos de onda pouco específicos e limitam o crescimento *in vitro* das espécies vegetais (Kim et al., 2004).

O desenvolvimento das lâmpadas diodo emissor de luz (LEDs) tornou-se uma fonte de luz promissora para o crescimento de plantas em ambientes controlados (Yeh e Chung, 2009). Comparado com as lâmpadas tradicionais, as características oferecidas pelas LEDs apresentam diversas vantagens nas culturas *in vitro*: são de menor tamanho, maior vida útil, temperatura de emissão fria e, mais recentemente, têm a opção de selecionar o comprimento de onda específico sendo mais sustentável que outras fontes de luz (Kim et al., 2004; Massa et al., 2008; Yeh e Chung, 2009; Fang et al., 2011). O sistema de iluminação com LEDs (brancas, azuis e, ou vermelhas) pode produzir alta densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) ou irradiância para comprimentos de onda específicos (Park et al., 2013), suficiente para promover o crescimento de cultivos hidropônicos (Lin et al., 2013), em câmaras de crescimento (Li e Kubota, 2009; Yano e Fujiwara, 2012; Hata et al., 2013), ou *in vitro* (Kim et al., 2004; Lin et al., 2011).

Além disso, o uso de LEDs nos sistemas de iluminação estende sua aplicabilidade em estudos sobre a influência de diferentes espectros de luz nos processos fisiológicos das plantas (Yu et al., 2005; Park et al., 2013) como fotossíntese, síntese de pigmentos, crescimento e desenvolvimento (Hogewoning et al., 2010); e em estudos fotomorfogênicos *in vitro* e síntese de metabólitos secundários (MS) (Kopsell e Kopsell, 2008; Yano e Fujiwara, 2012). Nesse sentido, a resposta do material vegetal *in vitro* ao aumento da biossíntese de alguns MS poderia ser influenciada pela adição de diversos elicitores bióticos ou abióticos no meio de crescimento (Almagro et al., 2009), e que a sua vez esses fatores promovem variações qualitativas e quantitativas que determinariam as propriedades medicinais das plantas (Gobbo-Neto et al., 2007). A luz é uma variável de grande importância nos processos fotoquímicos das plantas ou explantes das culturas *in vitro*, esta pode ser estudada quantificando o efeito na produção de MS, particularmente alcaloides, terpenoides e alguns compostos fenólicos (BourgauDET al., 2001).

Os compostos polifenólicos mais comumente encontrados nos extratos de plantas são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Sati et al., 2010). Os fenólicos têm sido relacionados à atividade antioxidante e associado à prevenção de doenças crônicas e degenerativas em humanos causadas pelos processos oxidativos nas células (Chang et al., 2007; Rudnicki et al., 2007; Boligon et al., 2012; Marroquín et al., 2012).

Para as Passifloras têm sido reportados alguns MS principalmente para *P. edulis* e *P. incarnata* já que são as espécies mais estudadas na área fitoquímica (Dhawan et al.,

2004; ANVISA, 2010; Patel et al., 2011). Os MS frequentemente encontrados nas Passifloras são os flavonoides C-glicosidados (Abourashed et al., 2002; Dhawan et al., 2004; Zeraik e Yariwake, 2010; Zucolotto et al., 2012). A presença deste tipo de flavonoides está associada a vários efeitos farmacológicos (Santos et al., 2006; Sena et al., 2009; Zucolotto et al., 2012), sendo sugerida a análise destes constituintes e sua caracterização química (Abourashed et al., 2002). Além disso, os flavonoides estão associados a múltiplas funções biológicas entre as quais a proteção contra radiação UV (Havsteen, 2002).

Para *P. mollissima* tem sido relatada a presença de alguns MS, entre eles o alcaloide passiflorina (Dhawan et al., 2004) e alguns constituintes voláteis (Froehlich et al., 1989). Nos últimos anos, a presença de flavonoides C-glicosilados nesta espécie também foi relatada por Zucolotto et al. (2012) constatando a presença de vicentina-2, swertisina, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina em folhas e fruto, e Simirgiotis et al. (2013) que encontraram uma faixa maior de flavonoides C-glicosilados e também de flavonoides O-glicosilados nos frutos.

Contudo, até o presente momento apenas 20-30% das plantas foram investigadas quimicamente, sendo elucidadas dezenas de MS e suas estruturas (Harborne e Williams, 2000). Para as Passifloras são vários os trabalhos sobre MS, na sua maioria com material vegetal de origem *ex vitro* (Dhawan et al., 2004; Johnson et al., 2008; Gosmann et al., 2011; Madhumathi et al., 2012), e alguns outros com o uso da irradiância UV para estudar a biossíntese de compostos fenólicos, como é o caso de *P. quadrangularis* (Antognoni et al., 2007) e *P. morifolia* (Albino, 2013).

Nesse contexto, é de importância estabelecer quais as mudanças físicas e químicas de vitroplantas de *P. mollissima* submetidas à luz branca com diferentes espectros de luz, para determinar irradiâncias estimuladoras da biossíntese de flavonoides e taninos em condições *in vitro*. Assim, para o presente trabalho objetiva-se avaliar a influência da irradiância no crescimento e desenvolvimento, no perfil fitoquímico, e no teor de flavonoides C-glicosilados e ácido tânico de vitroplantas de *Passiflora mollissima*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

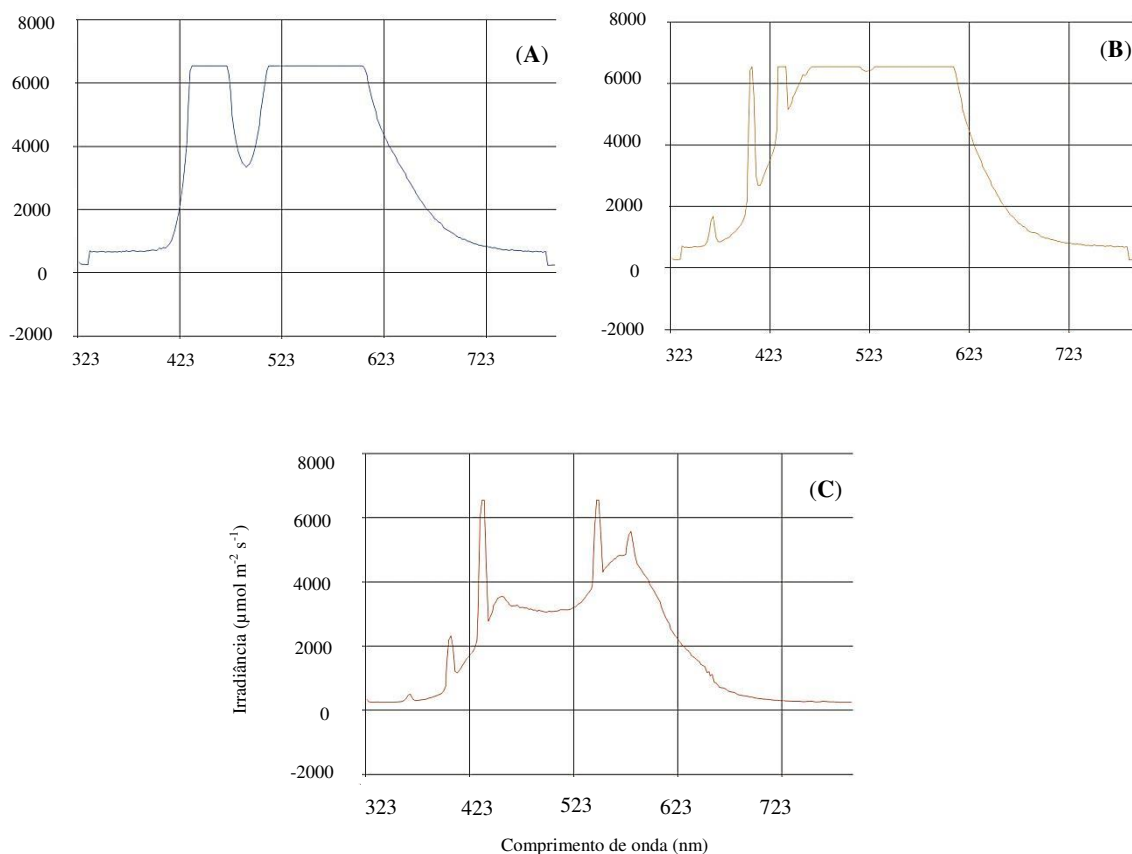
### 2.1 Material vegetal

As sementes utilizadas foram coletadas de frutos maduros de *Passiflora mollissima*, no município de Caldas (05°33''N 73°52''O), Departamento de Boyacá, Colômbia.

Com o auxílio de uma mini morsa, os tegumentos das sementes foram retirados segundo o protocolo estabelecido por Reis et al. (2007). As sementes foram desinfestadas sendo imersas por 1 min em álcool etílico 70% (v/v) e em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% v/v) acrescida de duas gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v) durante 15 min. Logo após, foram feitas três lavagens com água deionizada estéril.

Posteriormente, as sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 mL), contendo 60 mL de meio de cultura e 10 sementes por frasco, vedados com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm de poros (Milliseal<sup>®</sup>, AVS-045 Air Vent, Japão). O meio de germinação foi composto por sais Murashige e Skoog (1962) força total e o complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120°C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 15 dias no escuro e 45 dias no fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro). Os tratamentos *in vitro* foram constituídos por três diferentes irradiâncias fornecidas por 2 e 4 lâmpadas brancas LED (diodo emissor de luz de 17 W, Vilux<sup>®</sup>, LLTV03, Brasil) e 2 lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). Os tratamentos luminosos foram os seguintes: 2LED (PFF = 33 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); 4LED (PFF = 57 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); 2LF (PFF = 21 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Para visualizar a qualidade e quantidade de luz fornecida pelas lâmpadas foram utilizadas as leituras do radiômetro (LI-COR<sup>®</sup>, LI-250A Light Meter) e do espectrorradiômetro (SP100 Versão 1.0.0.1 Photo System Instruments, República Checa) (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição espectral da luz branca dos sistemas luminosos com lâmpadas diodo emissor de luz (LED) e lâmpadas fluorescentes (LF) no crescimento de vitroplantas de *P. mollissima*. Espectros de luz emitidos por 2LED (A), 4LED (B) e 2LF (C). O comprimento de onda que corresponde à faixa do azul (460 e 482 nm) e do vermelho (618 e 780 nm) apresentam menos flutuações nas lâmpadas LEDs que nas LF.

## 2.2 Análise de crescimento e desenvolvimento vegetal

Decorridos 60 dias após a inoculação das sementes para a germinação, as vitroplantas de *P. mollissima* foram excisadas separando-se as folhas, os caules e as raízes. As variáveis quantificadas foram: porcentagem de germinação (%), comprimento de caule e de raiz (cm), massa fresca (mg), massa seca (mg), pigmentos fotossintéticos por área foliar ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) e densidade estomática (estômatos  $\text{mm}^{-2}$ ).

Para obtenção da massa seca as amostras foram submetidas à secagem em estufa ventilada (ACBLABOR, Brasil) a 40 °C por 8 dias.

A determinação de pigmentos fotossintéticos foi realizada ajustando a metodologia descrita por Santos et al. (2008). Foram utilizados 2 discos foliares de 0,8 cm de diâmetro do primeiro par de folhas expandidas a partir do ápice, logo após foram colocados em tubos contendo 2,5 ml de dimetilsulfóxido saturado com carbonato de

cálcio (CaCO<sub>3</sub>) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil) por 48 h e mantidos no escuro a 27°C. As absorbâncias foram determinadas a 665, 645, e 480 nm (Wellburn, 1994) usando o espectrofotômetro (Genesys™ Scanning 10 UV/Visible, ThermoScientific, Madison, WI) com cubeta de quartzo. Os cálculos de clorofilas *a* e *b*, e carotenoides basearam-se na metodologia descrita por Wellburn (1994).

A densidade estomática foi estimada usando a impressão epidérmica da face abaxial do primeiro par de folhas completamente expandidas a partir do ápice de seis plantas independentes, totalizando 10 folhas por tratamento. O cálculo realizou-se com o software Anati Quanti (Aguiar et al., 2007) a partir de imagens capturadas no fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) a uma resolução de 20 x 1,0.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos (2LED, 4LED e 2LF) e seis repetições. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de Tukey a 5% de significância. Os dados foram analisados no programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

## **2.3 Análise fitoquímica**

### **2.3.1 Obtenção dos extratos**

As massas secas separadas em folhas, caules e raízes, obtidas em cada um dos tratamentos 2LED, 4LED e 2LF foram trituradas em moinho analítico (Quimis® LTDA, Modelo 0298A21), pesadas (450 mg de pó por amostra) e colocadas em erlenmeyer de 250 ml. Adicionaram-se, então, 20 mL de álcool etílico comercial (95% v/v) e, em seguida, o conteúdo foi homogeneizado e submetido a banho de ultrassom em sonicador (Branson 1210, Brasil) por 10 min. A suspensão obtida foi filtrada por gravidade e repetiu-se o procedimento de extração, utilizando o resíduo. Os filtrados foram combinados e concentrados em sistema de evaporação rotatória (OKA® RV 10 digital) com recirculador (TECNAL TE-184) e bomba com controlador de vácuo (DVP modelo ZA 60S9210006) sob pressão reduzida e temperatura de 40 °C em balões volumétricos de 200 mL. Os extratos foram removidos com álcool etílico comercial (95% v/v) e transferidos para outros frascos. Em seguida, os extratos foram colocados no banho maria a temperatura de 40 °C, até a evaporação completa do solvente. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira a 8 °C.

### 2.3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A determinação das principais classes de metabólitos secundários (MS) dos extratos de folhas, caules e raízes de *P. mollissima* foi realizada com a CCD. Utilizou-se uma repetição por cada tratamento e identificaram-se as principais classes de MS presentes nos extratos, segundo metodologia descrita por Wagner & Bladt (2001). Foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck<sup>®</sup>, Alemanha) de 3 x 5 cm para cada órgão, totalizando três placas para cada classe de MS.

**Tabela 1.** Condições da Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizadas na prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de folhas, caules e raízes de vitroplantas de *Passiflora mollissima*.

Classes de metabólitos secundários (MS)	Sistema de eluentes	Revelador	Cor de referência <sup>3</sup>	Compostos padrões
<b>Cumarinas</b>	CH <sub>3</sub> Ø:CHCl <sub>3</sub> :CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (60:20:20)	Solução de KOH a 5% em EtOH <sup>1</sup>	Fluorescência verde	Escopoletina
<b>Compostos antracênicos</b>	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O (57:29:14)	Solução de KOH a 5% em EtOH <sup>1</sup>	Fluorescência verde	Vitamina K3
<b>Alcaloides</b>	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O (50: 25: 25)	Reagente de Dragendorff <sup>2</sup>	Vermelho-laranja	Quinina
<b>Taninos</b>	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O:HCOOH (61:24:12:3)	Vanilina/ácido sulfúrico	Vermelho	Ácido tânico
<b>Triterpenos e esteroides</b>	CH <sub>3</sub> Ø:CHCl <sub>3</sub> :CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (67:22:11)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Verde, vermelho, amarelo e roxo	Limoneno e ergosterol
<b>Saponinas</b>	AcOEt: MeOH:H <sub>2</sub> O (48:48:4)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Azul o roxo-azul, amarelo	<i>Sapindus saponaria</i>
<b>Flavonoides</b>	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O (67:17:17)	AlCl <sub>3</sub>	Fluorescência amarela e verde	Vitexina, Rutina

CH<sub>3</sub>Ø: tolueno; CHCl<sub>3</sub>: clorofórmio; CO(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: acetona; AcOEt: acetato de etila; HCOOH: ácido fórmico; H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol.

<sup>1</sup>Observações sob luz UV λ 366 nm.

<sup>2</sup>Reagente de Dragendorff: sal de bismuto + ácido acético + iodeto de potássio (Wagner & Bladt, 2001).

<sup>3</sup>Farnsworth, 1966.

Para o preparo dos padrões e dos extratos, foram pesados 1,0 mg da substância padrão e 5,0 mg do extrato seco diretamente em tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade adicionando-se 1,0 mL de metanol. As soluções foram solubilizadas com o auxílio de um agitador e do banho de ultra-som durante 10 min.

Em cada cromatoplaça foram colocadas alíquotas de 2,5 µL da solução padrão e de 30 µL do extrato de cada tratamento com ajuda de um capilar. Posteriormente, as cromatoplaças foram eluídas na cuba cromatográfica previamente saturada pelo sistema de eluentes específico de cada classe de MS nas condições descritas na Tabela 1.

### **2.3.3 Testes histoquímicos para flavonoides, taninos e alcaloides**

Para os testes histoquímicos, amostras frescas da região mediana do limbo foliar e do pecíolo, segundo internó do caule e porção mediana da raiz principal foram seccionadas em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA). As secções transversais dos diferentes órgãos de cada tratamento foram submetidas aos seguintes reagentes: cloreto de alumínio para detecção de flavonoides (Charrière – Ladreiex, 1976); vanilina clorídrica (Mace e Howell, 1974) para detecção de taninos e reagente de Wagner para detecção de alcaloides (Furr e Mahlberg, 1981).

A captura das imagens foi realizada em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic Instruments Inc., Spot Insightcolour 3.2.0, EUA) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

## **2.3 Teor de flavonoides C-glicosilados e taninos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Amostras do extrato seco (15 mg) foram pesadas diretamente em tubos Eppendorf e solubilizadas em 15 mL de metanol. Para homogeneizar a solução as amostras foram agitadas, colocadas no banho de ultrassom e, em seguida, centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante das soluções foi transferido para frascos.

A análise foi realizada em um cromatógrafo (SHIMADZU), equipado com um detector modelo SPD-10A VP acoplado ao detector ultravioleta, utilizando-se dois comprimentos de ondas: 340 nm, para os flavonoides e 280 nm para o ácido tânico. A coluna utilizada para a separação foi a C18 de fase reversa (45 x 4,5 mm x 5 µm), com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e pressão de 42 Kgf. Utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente: Bomba A: Água (1% de ácido orto-fosfórico) e Bomba B: Metanol. Iniciou com 85% de A e 15% de B, por 10 min, e em seguida variou 15% de A até 85% de B por 65 min. O volume de injeção foi de 10 µL. As soluções padrões usadas foram

vitexina, isovitexina e orientina, para flavonoides C-glicosilados, e ácido tânico para taninos (Extrasynthese<sup>®</sup>, França). As curvas de calibração foram obtidas a partir das soluções padrão diluídas em metanol e de acordo com as informações apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentrações usadas na curva de calibração para cada solução padrão dos metabólitos secundários quantificados na CLAE.

<b>Padrões</b>	<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Curva de calibração</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Orientina</b>	1, 5, 10, 20, 40	$y = 88651x - 14861$	0,9989
<b>Vitexina</b>	20, 50, 100, 200, 400	$y = 109614x - 580633$	0,9993
<b>Isovitexina</b>	1, 5, 10, 20, 40, 60	$y = 104874x + 90396$	0,994
<b>Ácido tânico</b>	10, 20, 40, 80, 100,	$y = 33327x - 18023$	0,9996

### 2.3.4 Avaliações e análises estatísticas

A prospecção fitoquímica foi constituída pelo componente qualitativo determinando a presença ou ausência de MS na CCD e nos testes histoquímicos de material a fresco. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) dos níveis de irradiâncias (2LED, 4LED e 2LF) e dos órgãos (folha, caule e raiz) com quatro repetições. Com a CCD foi realizada a caracterização qualitativa dos extratos, depois da determinação dos sistemas de eluentes e reveladores para cada classe de MS. A presença ou ausência dos compostos nos extratos foram registradas segundo a cor e posição das manchas na placa cromatográfica. A posição foi calculada em relação à substância padrão pelo fator de retenção (Rf) como segue:

$$\left( Rf = \frac{\text{distância percorrida pelo composto}}{\text{distância percorrida pelo eluente}} \right)$$

Para os testes histoquímicos, o parâmetro de avaliação foi dado pela reação positiva dos flavonoides (cor verde fluorescente), taninos (vermelho) e alcaloides (vermelho-acastanhado).

Na quantificação de flavonoides C-glicosilados e taninos por CLAE, o delineamento experimental foi conduzido em um DIC com seis repetições. O cálculo das concentrações de orientina, vitexina, isovitexina e ácido tânico foram realizados usando a equação obtida com as curvas de calibração do CLAE. O valor dos flavonoides

C-glicosilados foi produto da sumatoria das concentrações de orientina, vitexina e isovitexina.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de Tukey a 5% de significância. Os dados foram analisados no programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

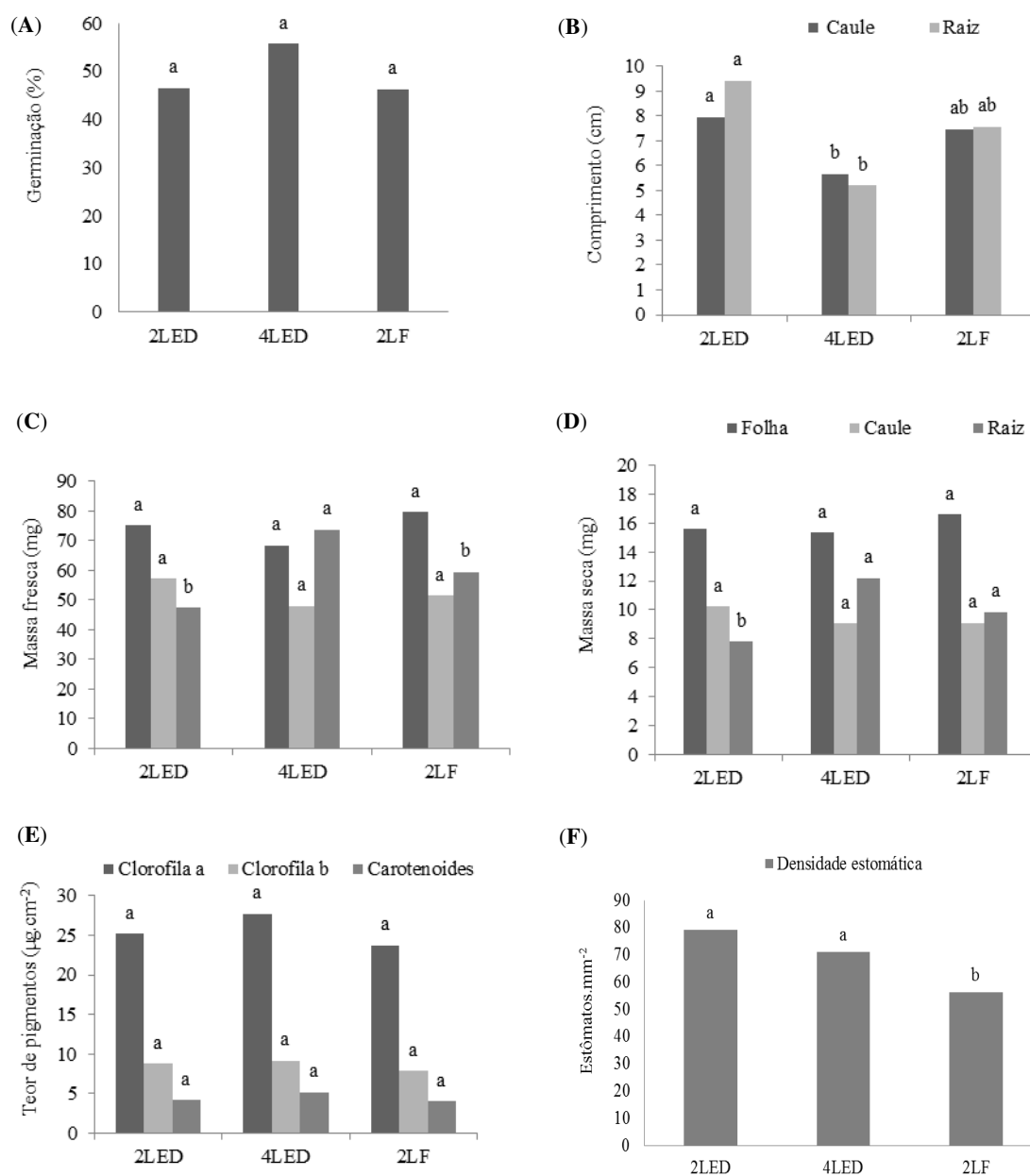
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análises de crescimento e desenvolvimento vegetal

A exposição de vitroplantas de *P. mollissima* a diferentes irradiâncias apresentou variação nos parâmetros de crescimento e desenvolvimento vegetal. Para a variável porcentagem de germinação das sementes não houve diferenças significativas nos tratamentos avaliados (Figura 2A). Para o comprimento de caule o tratamento 2LED apresentou valores significativamente superiores (7,94 cm) apenas quando comparado ao tratamento 4LED (5,66 cm) (Figura 2B). A variável comprimento de raiz apresentou resultados similares ao comprimento de caule, em que os valores de 2LED (9,42 cm) diferiram estatisticamente apenas das vitroplantas crescidas sob 4LED (5,21 cm) (Figura 2B).

Não houve diferenças significativas nas variáveis massas fresca (Figura 2C) e seca (Figura 2D) das folhas e dos caules nas três irradiâncias dos sistemas luminosos. Já para massa fresca das raízes, o tratamento 4LED foi significativamente superior aos demais tratamentos (Figura 2C). Enquanto que para a massa seca das raízes, 4LED diferiu estatisticamente apenas quando comparado a 2LED entre órgãos e tratamentos (Figura 2D).

Em relação aos pigmentos fotossintéticos não houve diferença significativa entre as clorofilas *a*, clorofila *b*, e carotenoides nas diferentes condições luminosas (2LED, 4LED e 2LF) (Figura 4E). Na densidade estomática (estômatos  $\text{mm}^{-2}$ ) encontrou-se valores superiores com diferença estatística nos tratamentos com lâmpadas LED (2LED e 4LED) em comparação com o tratamento 2LF (Figura 4F).



**Figura 2.** Valores médios dos parâmetros de germinação e crescimento *in vitro* de vitroplantas de *Passiflora mollissima* sob diferentes irradiâncias (2LED, 4LED e 2LF). (A) Porcentagem de germinação (%); (B) Comprimento de caule e raiz (cm); (C) Massa fresca de folha, caule e raiz (mg); (D) Massa seca de folha, caule e raiz (mg); (E) Teor de pigmentos fotossintéticos, (clorofilas a e b e carotenoides;  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ); e (F) Densidade estomática. (A) Letras diferentes nas médias indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ( $P < 0,05$ ). (B; C; D; E) Letras diferentes nas médias para folhas, caules ou raízes não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

## 3.2 Prospecção fitoquímica

### 3.2.1 Rendimento extrativo

Os extratos etanólicos obtidos após secagem das plantas de *P. mollissima* foram caracterizados por apresentarem aparência viscosa e higroscópica. Além disso, observou-se que os extratos provenientes das vitroplantas apresentaram coloração verde-escura (folhas) e verde (caules e raízes).

A porcentagem do rendimento extrativo foi superior para as folhas nas diferentes irradiâncias fornecidas, o valor médio foi de 36%. No entanto para caule e raiz os maiores rendimentos extrativos apresentaram particularmente uma diferença entre tratamentos. Para o primeiro, caule, com o tratamento 2LED o rendimento extrativo foi de 34%, valor superior aos obtidos para 4LED e 2LF. Já para raiz com 2LF o rendimento extrativo foi de 36%, porcentagem superior aos demais tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores da porcentagem do rendimento dos extratos de folhas, caules e raízes de *Passiflora mollissima* cultivadas em diferentes irradiâncias *in vitro*.

Irradiância	Porcentagem do rendimento dos extratos (%)		
	Folha	Caule	Raiz
2LED	37	34	29
4LED	37	29	22
2LF	36	28	36

### 3.2.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Por meio da CCD constatou-se a presença e ausência de alguns dos principais metabólitos secundários, encontrando-se a ausência de cumarinas, compostos antracênicos e alcaloides e verificando a presença de taninos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides nos diferentes órgãos de *P. mollissima* (Tabela 4).

Nos compostos presentes nos extratos metanólicos evidenciou-se a presença de ácido tânico ( $R_f = 0,875$ ), composto que pertence aos taninos, principalmente nas folhas de *P. mollissima* de maneira independente ao tratamento de irradiância usado (Figura 4).

Em todos os tratamentos evidenciou-se a presença de terpenoides e esteroides de acordo com a coloração das manchas e  $R_f$  dos padrões. Nos extratos de folhas submetidas a 2LED e caule e raiz, a 2LF, foram detectados compostos terpênicos

similares ao padrão limoneno ( $R_f = 0,625$ ). Também, encontraram-se manchas similares ao ergosterol nos diferentes extratos derivados do tratamento 2LED; porém constatou-se a ausência deste composto nos extratos de folhas e caules submetidos a 4LED.

Em relação às saponinas, com a CCD encontrou-se ampla variedade de compostos similares às substâncias padrão empregadas. Evidenciou-se que os extratos de folhas e caules submetidos à irradiância com 2LED apresentaram várias manchas similares ao padrão, enquanto que nos extratos de raízes foram os tratamentos 2LF e 4LED. Menor frequência de manchas de saponinas foi observada nas folhas sob 2LF e caules sob 4LED (Tabela 4).

Nos flavonoides, a presença do padrão rutina com  $R_f = 0,475$  foi comum para o extrato de folhas nos tratamentos 4LED e 2LF. Os extratos de raízes apresentaram os dois padrões, rutina e vitexina, nos tratamentos 2LED e 4LED (Tabela 4).

**Tabela 4.** Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos metanólicos de folhas, caules e raízes de vitroplantas de *Passiflora mollissima* submetidas a diferentes irradiâncias.

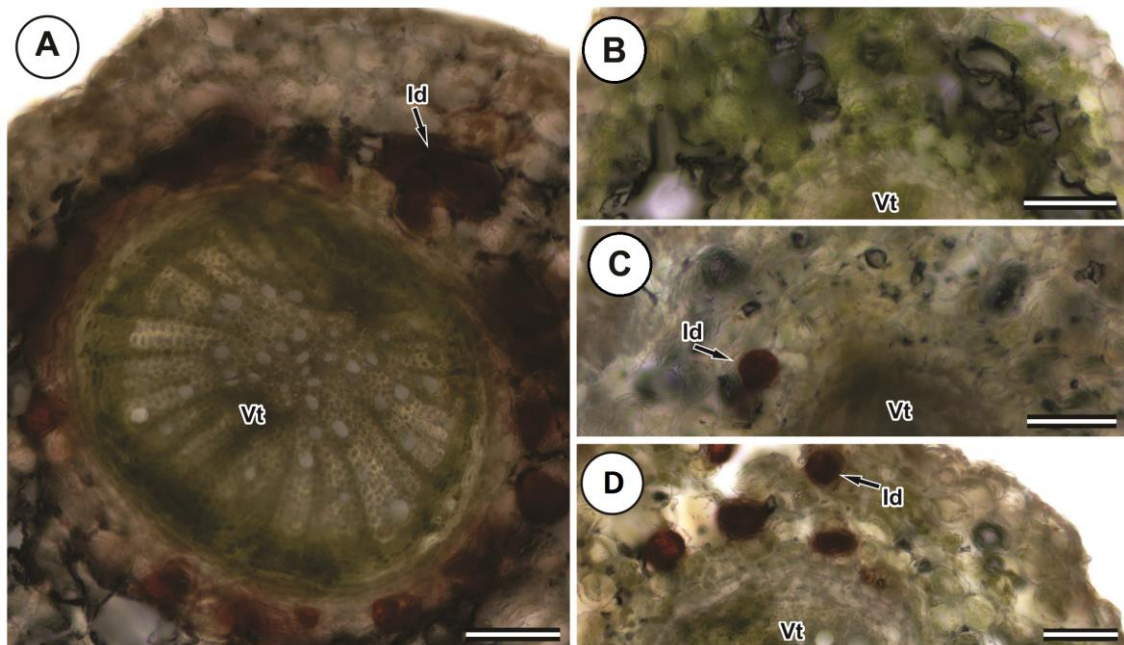
Classe de metabólitos secundários (MS)	$R_f^1$	2LED			4LED			2LF		
		Folha	Caulo	Raiz	Folha	Caulo	Raiz	Folha	Caulo	Raiz
Cumarinas (Escopoletina)	0,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Compostos antracênicos (Vitamina K3)	0,625	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides (Chinin)	0,750	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos (Ácido tânico)	0,825	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Terpenoides e esteroides (Limoneno e ergosterol)	0,625 <sup>2</sup>	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	0,450 <sup>3</sup>	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Saponinas <sup>4</sup> (Extrato cru de <i>Sapindus saponaria</i> )	0,875	+	+	+	-	-	+	-	+	+
	0,700	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	0,650	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	0,625	++	+	+	+	-	+	-	+	+
	0,500	-	+	+	-	-	+	-	+	+
	0,375	-	+	+	-	++	+	-	+	+
	0,200	+	-	-	++	-	-	-	-	-
	0,150	-	-	+	-	-	++	-	-	+
0,125	++	-	-	++	-	-	+	-	-	
Flavonoides (Vitexina, Rutina)	0,475 <sup>5</sup>	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	0,275 <sup>6</sup>	-	-	+	-	-	+	-	-	-

+ Presença; - Ausência; \*Menor abundância; ++ Maior abundância; LED: Diodo emissor de luz; LF: Lâmpada fluorescente.

<sup>1</sup> $R_f$ : Fator de retenção; <sup>2</sup>Limoneno; <sup>3</sup>Ergosterol; <sup>4</sup>Todos os  $R_f$  de saponinas correspondem ao padrão; <sup>5</sup>Vitexina; <sup>6</sup>Rutina.

### 3.3 Presença de taninos na análise histoquímica

Mediante o teste histoquímico verificou-se a ausência de flavonoides e alcaloides nas folhas, caule e raiz de *P. mollissima* crescidas em diferentes condições luminosas, confirmado também na CCD (Tabela 4). Assim mesmo, constatou-se a presença de taninos unicamente nos tecidos de raiz (Figura 4) e caule (dados não mostrados). Os taninos acumularam-se nos idioblastos localizados na região parenquimática da raiz. O tratamento 2LED apresentou marcação intensa, vermelha, na periferia do tecido vascular (Figura 4A) quando comparado com o branco (Figura 4B). Já nos tratamentos com 4LED (Figura 4C) e 2LF (Figura 4D) detectou-se menor intensidade de coloração dos idioblastos na mesma região do corte.



**Figura 4.** Teste histoquímico para taninos em cortes transversais da raiz de *P. mollissima* submetida a diferentes condições de cultivo: (A) 2LED, (B) Branco *in vitro*, (C) 4LED, e (D) 2LF. Coloração vermelha indica reação positiva. Abreviaturas: Id, idioblastos; Vt, tecido vascular. (Barra = 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.4 A luz na concentração de flavonoides C-glicosilados e taninos por CLAE

A maior concentração de orientina foi encontrada com 2LED nos extratos de folhas ( $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ), caules ( $1,43 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e raízes ( $1,45 \mu\text{g g}^{-1}$ ), sendo significativamente superiores aos valores observados no tratamento com 4LED e 2LF em todos os extratos.

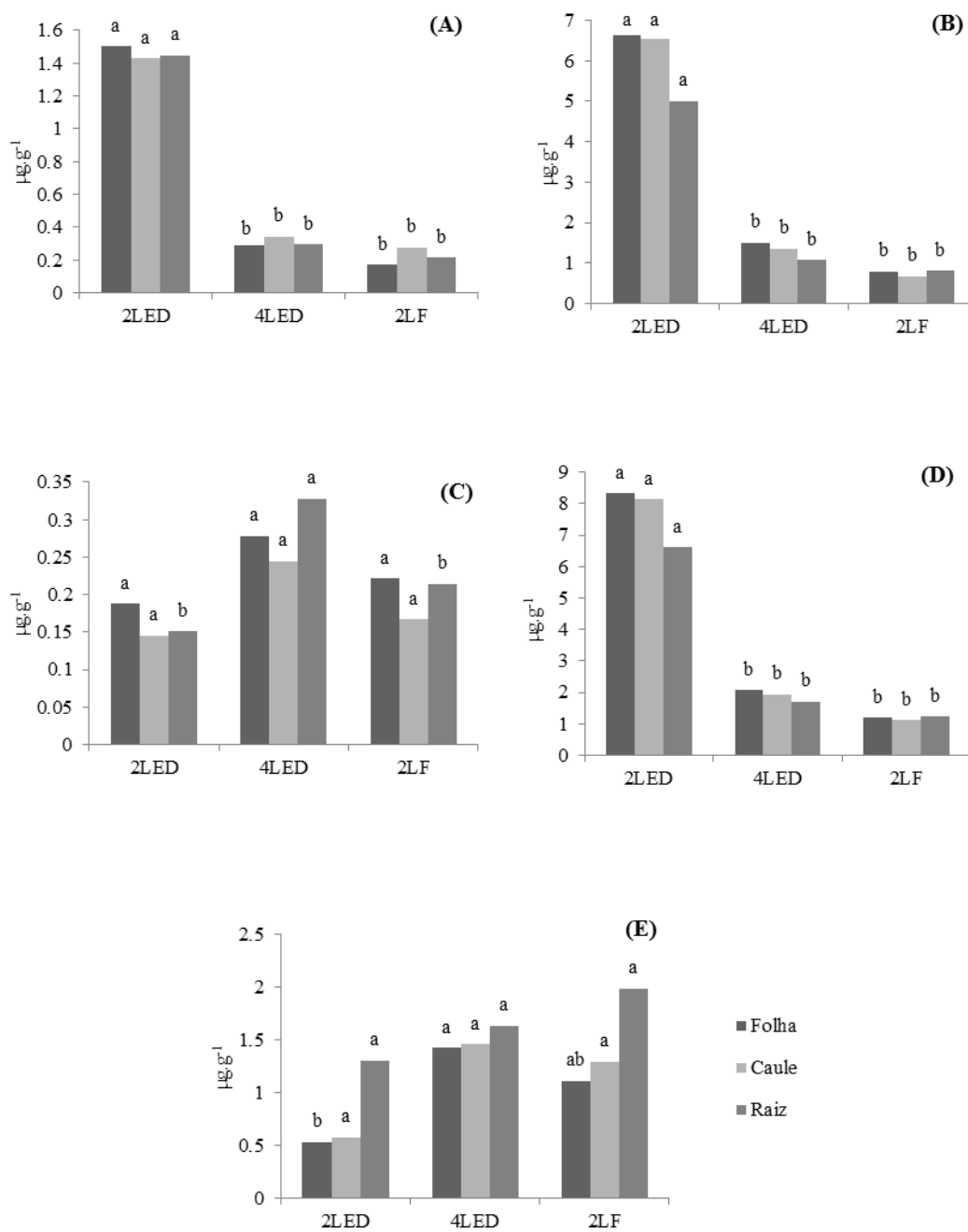
A maior concentração de orientina nos extratos quantificados foi para as folhas submetidas a irradiância com 2LED (Figura 5A).

A concentração de vitexina foi superior com o tratamento 2LED em relação aos demais flavonoides C-glicosilados e o ácido tânico. Os valores encontrados nos extratos de folhas ( $6,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ), caules ( $6,56 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e raízes ( $5,00 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram significativamente maiores em comparação aos obtidos com os sistemas luminosos providos de 2LF e 4LED (Figura 5B).

De outro lado, com o tratamento 4LED foram registradas as maiores concentrações de isovitexina nos extratos de folhas e caules, mas sem diferenças significativas. Enquanto que os extratos de raízes apresentaram concentração de isovitexina com diferença estatística, sendo superior no tratamento com 4LED ( $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ) comparativamente a 2LED ( $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e a 2LF ( $0,21 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Além disso, este último resultado também foi superior às concentrações encontradas nas folhas e caules (Figura 5C).

No tratamento com 2LED, as concentrações médias de flavonoides C-glicosilados foram significativamente superiores para os extratos de folhas ( $8,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ), caules ( $8,13 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e raízes ( $6,60 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em relação aos demais sistemas luminosos. De maneira contrastante, uma menor concentração de flavonoides C-glicosilados ocorreu nas vitroplantas cultivadas sob 2LF (Figura 5D).

Para o ácido tânico, a maior concentração nos extratos das folhas apresentaram valores superiores com a utilização de 4LED ( $1,42 \mu\text{g g}^{-1}$ ) diferindo estatisticamente da irradiância fornecida por 2LED ( $0,53 \mu\text{g g}^{-1}$ ). No extrato de caules, encontrou-se que o tratamento 4LED apresentou a maior concentração deste composto ( $1,46 \mu\text{g g}^{-1}$ ), embora sem diferença significativa com 2LED ( $0,58 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e 2LF ( $1,29 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Constatou-se, ainda, maior concentração de ácido tânico nas raízes obtidas sob 2LF ( $1,99 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e menores com 2LED ( $1,30 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e 4LED ( $1,64 \mu\text{g g}^{-1}$ ), todavia, sem diferenças significativas entre as mesmas. De igual forma, os valores para o ácido tânico nas raízes foram superiores aos obtidos nas folhas e nos caules (Figura 5E).



**Figura 5.** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de orientina (A), vitexina (B), isovitexina (C), flavonoides C-glicosilados (D) e ácido tânico (E) nas folhas, caule e raiz de vitroplantas de *Passiflora mollissima* submetidas a diferentes irradiâncias (2LED, 4LED e 2LF). Letras diferentes nas médias de folha, caule e raiz não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, constatou-se a influência dos níveis de irradiância de duas fontes de luz (LEDs e LF) no desenvolvimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários (MS) sobre vitroplantas de *Passiflora mollissima*. Segundo Nhut et al. (2003), as lâmpadas de LED proporcionam maior atividade fotossintética nas plantas, dado que os espectros de emissão das LEDs na faixa do azul (460 e 482 nm) e vermelho (618 e 780 nm) coincidem com a absorção das clorofilas *a* e *b*. Sendo já descrito que a irradiância (Kim et al., 2004; Cui et al., 2000) e qualidade de luz (Saebo et al., 1995) influenciam o crescimento e fotossíntese, as variáveis de crescimento de *P. mollissima* apresentaram respostas diferentes com cada irradiância usada. As vitroplantas de *P. mollissima* submetidos à luz branca fluorescente (LF) mostraram menor comprimento de caule e raiz, e massas secas e frescas comparadas aos demais tratamentos (LEDs), resultado já descrito em outras espécies *in vitro* com esse tipo de lâmpadas (Kim et al., 2004; Lin et al., 2011).

Quanto aos pigmentos fotossintéticos, parece que os mecanismos de fotoproteção das vitroplantas não foram alterados pelas diferentes irradiâncias nem comprimentos de onda das lâmpadas LEDs e LF. O excesso de luz pode causar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através das clorofilas e o dano do transporte de elétrons nos cloroplastos (Minkov et al., 1999), o qual não foi evidenciado na condição experimental das vitroplantas de *P. mollissima* já que não houve diferença estatística na presença de clorofilas *a* e *b*. De outro lado, os carotenoides apresentam uma função de fotoproteção contra os danos da foto-oxidação (Behera et al., 2002), além de atuarem como acessórios no complexo antena e na proteção do aparelho fotossintético pelo aumento na irradiância. Para *P. mollissima* o efeito da irradiância não foi prejudicial, possivelmente associado ao relatado por Choudhury e Behera (2001) que afirmaram que, em alguns casos, o excesso de luz atua como um tipo de sinal hormonal ligado aos fotorreceptores e não de maneira negativa.

No entanto, para *P. mollissima* não foi encontrado um nível de irradiância que promoveu, de forma notória, um maior crescimento das folhas. No entanto, a densidade estomática foi superior nas folhas expostas a LEDs. Este resultado possivelmente foi influenciado pela qualidade de luz das lâmpadas, já que as LEDs apresentam uma distribuição homogênea dos comprimentos de onda na faixa do azul e vermelho, as

quais são preferencialmente aproveitadas pelas plantas na abertura estomática (Kim et al., 2004).

Segundo o perfil fitoquímico realizado mediante a CCD, foi evidenciado que a presença ou ausência dos MS não esteve influenciada pelas irradiâncias fornecidas, porém a concentração de flavonoides C-glicosilados e de taninos, quantificada pela CLAE, apresentaram uma resposta positiva a sistemas luminosos específicos.

Na prospecção fitoquímica constatou-se a ausência de cumarinas, compostos antracênicos e alcaloides, e presença de taninos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides nos diferentes extratos dos diferentes órgãos das vitroplantas. Particularmente, a presença de alcaloides em algumas passifloráceas como *P. edulis* foi relatada usando vários testes fitoquímicos para os extratos de folhas e frutos (Abourashed et al., 2002; Johnson et al., 2008), porém para *P. mollissima* este grupo de MS não foi detectado, e possivelmente este resultado esteja associado a características próprias da espécie.

Outros MS de importância em passifloráceas são os terpenoides, esteroides e saponinas. De acordo aos resultados, constatou-se a presença de terpenoides e esteroides, principalmente nos extratos de folhas de *P. mollissima in vitro*, e na irradiância de 2LF em todos os órgãos. O padrão usado, limoneno, é um monoterpeneo que tem sido citado como constituinte do odor nos frutos em *Passiflora* (Oliveira et al., 2012) e não tinha sido referenciado em órgãos diferentes para outras espécies. Um estudo usando luz UV na detecção de terpenoides já tinha sido relatada para o gênero (Gil et al., 2012), mas não especificamente usando lâmpadas do tipo LED ou LF.

A presença de saponinas foi constatada nos extratos de folhas, caules e raízes de *P. mollissima*, sendo que a maior diversidade de compostos saponínicos, de acordo ao padrão, foi encontrada nos extratos das folhas e dos caules submetidas ao sistema luminoso provido de 2LED e na raiz com 2LF. Este MS também foi encontrado nos extratos de folhas de *P. edulis* (Johnson et al., 2008), *P. incarnata* (Madhumathi et al., 2011) e *P. alata* (Reginato et al., 2004) sob condições *ex vitro*. Na atualidade, existe crescente interesse no estudo de saponinas devido às propriedades biológicas que possuem o que sugere, a condução de estudos sobre a estimulação da biossíntese *in vitro* das saponinas usando elicitores como a luz (Faizal e Geelen, 2013).

Dentre os compostos fenólicos, encontram-se os flavonoides e taninos. A luz é o fator preponderante na biossíntese de compostos fenólicos através da atividade enzimática da fenilalanina amonioliase (PAL), a qual é aumentada pelas condições de

estresse (Havsteen, 2002; Pansera et al., 2003; Mradu et al., 2012), como por exemplo mudanças nas condições luminosas *in vitro* como a irradiância. Além disso, segundo Harborne e Williams (2002) a função de fotoproteção contra radiação UV está envolvida na rota biossintética dos flavonoides, observando mudanças nos níveis de flavonoides, principalmente nas folhas.

Os taninos ocorrem aproximadamente em 30% das famílias das plantas superiores (Pansera et al., 2003). Para *P. mollissima* foi observada a presença do ácido tânico através de CCD principalmente nos extratos de folhas de todos os tratamentos luminosos (2LED, 4LED e 2LF). A presença de taninos já foi reportada para *P. edulis* em folhas e frutos crescidos em condição *ex vitro* (Johnson et al., 2008). O ácido tânico foi encontrado sobretudo nos extratos das raízes de vitroplantas de *P. mollissima* (Tabela 4 e Figura 5). E notadamente, *P. mollissima* apresenta resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae* (Oliveira, 1987), o que pode estar relacionado com a presença de taninos. Os taninos, também são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas, dada a complexação entre taninos e proteínas, base das propriedades biológicas no controle de insetos, fungos e bactérias (Aerts et al., 1999; Tian et al., 2009).

Em *Passiflora* os flavonoides representam os compostos fenólicos mais diversos e abundantes, entre estes os do tipo C-glicosilados os mais representativos são compostos derivados de apigenina e luteolina (vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, schaftosídeo e isoschaftosídeo) (Abourashed et al., 2002; Dhawan et al., 2004; Johnson et al., 2008; Gosmann et al., 2011). Para vários maracujazeiros, incluída *P. mollissima*, foi registrada a presença dos flavonoides C-glicosilados nos extratos de folhas e frutos (Zucolotto et al., 2012; Moreira et al., 2012; Simirgiotis et al., 2013) e de calos (Albino, 2013). Segundo o relatado por Antognoni et al. (2007) a cultura de calos de folhas de *P. quadrangularis* exposta à luz ultravioleta-B (UV-B) promoveu o aumento na produção dos flavonoides, abrindo perspectivas para o aprofundamento no estudo de outros tipos de luz.

Os resultados da determinação do teor de flavonoides C-glicosilados (orientina, vitexina e isovitexina) e ácido tânico por CLAE indicaram que as concentrações nos diferentes extratos de folhas, caules e raízes de *P. mollissima* foram estimuladas pelos níveis de irradiâncias usadas. A irradiância fornecida com um sistema luminoso provido por 2LED favoreceu a biossíntese de uma alta concentração de orientina ( $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e vitexina ( $6,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ) nas folhas; por 4LED de isovitexina na raiz ( $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e por

2LF de ácido tânico na raiz ( $1,99 \mu\text{g g}^{-1}$ ), valores superiores aos encontrados em material de origem *ex vitro* da mesma espécie e com idade fisiológica maior (dados não mostrados).

Nos frutos de *P. mollissima* também foi demonstrada a presença dos flavonoides C-glicosilados entre os quais enocontraram-se vicentina-2, swertisina, isorientina, orientina, vitexina, isovitexina, luteolina e luteolina-6-glicosilado (Zucolotto et al., 2012; Simirgiotis et al., 2013). No entanto, Abourashed et al. (2002) relataram unicamente a presença de isovitexina (0,04%) nos extratos de frutos de *P. mollissima*. Assim mesmo, a presença de orientina já foi relatada para *P. edulis* e *P. incarnata* nos extratos de folhas adultas (Dhawan et al., 2004; Gosmann et al., 2011). De maneira similar a *P. mollissima*, para os extratos de folhas de *P. edulis* foi descrito que a concentração de vitexina era superior a outros flavonoides (Zeraik e Yariwake, 2010). Para *P. edulis* (Abourashed et al., 2002) e *P. incarnata* foi demonstrado que a máxima concentração de isovitexina nas folhas (Dhawan et al., 2004) apresentou-se entre os estágios de pré-florescimento e florescimento (Menghini et al., 1993).

Como descrito por Yu et al. (2005) as características da irradiância, como comprimento de onda, intensidade e fotoperíodo, influenciam o crescimento vegetal e a produção de MS nas culturas heterotróficas *in vitro*. Em concordância, para *P. mollissima* a quantidade de MS pode ser estimulada pelo tipo de lâmpada e as características de qualidade e quantidade de luz nas condições *in vitro*.

Dado que na atualidade existe interesse na extração e identificação de flavonoides C-glicosilados e taninos para a aplicação farmacêutica este estudo poderá auxiliar futuras pesquisas com esta espécie em áreas multidisciplinares (farmacêutica, bioquímica entre outras), dado que a luz é um fator relativamente pouco estudado neste campo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abourashed ES, Vanderplank JR, Khan IA (2002) High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology** 40: 81-91.

Aerts TJ, Barry TN, McNabb WC (1999) Polyphenols and agricultural: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 75: 1-12.

Aguiar TV, Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Ferreira RS (2007) Anati Quanti: Quantitative Analysis Software for Plant Anatomy Studies. **Planta Daninha** 25: 649-659.

Almagro L, Sabater-Jara AB, Belchí-Navarro S, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA (2009) Effect of UV Light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. In: **Plants and Environment**, <http://www.intechopen.com>. Acesso setembro de 2013.

Albino BES (2013) **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 83p.

ANVISA (2010) **Farmacopeia Brasileira**. 5ed. Brasília. 1448p. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd_farmacopeia/index.htm). (Acesso, Setembro de 2013).

Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia** 78: 345-352.

Behera RK, Mishra PC, Choudhury NK (2002) High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. **Journal of Plant Physiology** 159: 967–973.

Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Review: Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161: 839–851.

Boligon AA, De Brum TF, Froelich JK, Froeder ALF, Athayde ML (2012) HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. **Research Journal of Phytochemistry** 6: 84-91.

Chang HC, Huang G J, Agrawal DC, Kuo CL, Wu CR, Tsay HS (2007) Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as Gusuibu. **Botanical Studies** 48: 397-406.

Charrière - Ladriex Y (1976) Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta** 129:167-174.

Choudhury NK, Behera RK (2001) Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplasts. **Photosynthetica** 39: 481–488.

Cruz, CD (2006). **Programa Genes** - Aplicativo computacional em genética e estatística. Disponível em: [www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm). Acesso agosto de 2013.

Cui Yi, Hahn EJ, Kozai T, Paek KY (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 219–226.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004) *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology** 94: 1-23.

Faizal A, Geelen D (2013) Saponins and their role in biological processes in plants. **Phytochemistry Reviews** DOI 10.1007/s11101-013-9322-4.

Fajardo D, Angel F, Grum M, Tohme J, Lobo M, Roca WM, Sanchez I (1998) Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica** 101: 341–347.

Falguera V, Sánchez-Riaño AM, Quintero-Cerón JP, Rivera-Barrero CA, Méndez-Arteaga JJ, Ibarz A (2012) Characterization of polyphenol oxidase activity in juices from 12 underutilized tropical fruits with high agroindustrial potential. **Food and Bioprocess Technology** 5: 2921-92927.

Fang W, Chen CC, Lee YI, Chang MY (2011) Development of LED lids for tissue culture lighting. **Acta Horticulturae** 907: 397–402.

Farnsworth NR (1966) Biological and Phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 55: 225 – 276.

Froehlich O, Duque C, Schreier P. (1989) Volatile constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 37: 421–425.

Furr M, Mahlberg PG (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** 44: 153-159.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** 50: 151-158.

Gil M, Pontin M, Berli F, Bottini R, Piccoli P (2012) Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. **Phytochemistry** 77: 89-98.

Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** 30: 374-381.

Gosmann G, Provencil G, Comunello LN, Rates SMK (2011) Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências** 9: 88-99.

Hamamoto H, Shimaji H, Higashide T (2003) Budding and bolting responses of horticultural plants to night-break treatments with LEDs of various colors. **Journal of Agricultural Meteorology** 59: 103–110.

Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55: 481-504.

Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** 96: 67–202.

Hata N, Hayashi Y, Ono E, Satake H, Kobayashi A, Muranaka T, Okazawa A (2013) Differences in plant growth and leaf sesamin content of the lignan-rich sesame variety ‘Gomazou’ under continuous light of different wavelengths. **Plant Biotechnology** 30: 1–8.

Hogewoning SW, Trouwborst G, Maljaars H, Poorter H, Van Ieperen W, Harbinson J (2010) Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. **Journal of Experimental Botany** 61: 3107–3117.

Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) (2005) URL <http://www.invima.gov.co> (acesso Setembro de 2013).

Johnson M, Maridass M, Irudayaraj V (2008) Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Passiflora edulis*. **Ethnobotanical Leaflets** 12: 425-432.

Kannan B, Parimala D, Jayakar B (2011) Antibacterial activity of *Passiflora ligularis* S. **International Journal of Chemical Sciences** 9: 393-396.

- Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae** 101: 143–151.
- Kopsell DA, Kopsell DE (2008) Genetic and environmental factors affecting plant lutein/zeaxanthin. **Agro FOOD Industry Hi Tech** 19: 44–46.
- Lin Y, Li J, Li B, He T, Chun Z (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 329–335.
- Lin K-H, Huang M-Y, Huang W-D, Hsu M-H, Yang Z-W, Yang C-M (2013) The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Scientia Horticulturae** 150: 86–91.
- Li Q, Kubota C (2009) Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany** 67: 59–64.
- Mace Me, Howell CR (1974) Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** 52: 2423-2426.
- Madhumathi S, Rajendran A (2011) Antimicrobial activity of leaf extract of *Passiflora incarnata* L. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology** 2: 481-486.
- Marroquín MN, Cruz SM, Cáceres A. (2012) Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. Proceedings of the International Society on Medicinal and Aromatic Plants – IMAPS 2010 and “History of Mayan Ethnopharmacology” – IMAPS 2011 Eds.: J. Ghaemghami et al. **Acta Horticulturae** pp. 93-98.
- Massa GD, Kim H-H, Wheeler RM, Mitchell CA (2008) Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience** 43: 1951–1 956.
- Menghini A, Capuccella M, Mercat V, Mancini L, Burata M (1993) Flavonoids contents in *Passiflora* spp. **Pharmacology Research Communications** 27: 13–14.
- Minkov IN, Jahoubjan GT, Denev ID, Toneva VT (1999) **Photooxidative stress in higher plants**. In: Pessrakli M (ed) Handbook of Plant and Crop Stress, 2nd edition. Marcel Dekker, New York, Basel, pp 499– 525.
- Moreira CPS, Silva CG, Almeida VL (2012) Propriedades químicas e medicinais do maracujá. **Informe Agropecuário** 33: 7-16.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.

Mradu G, Saumyakanti S, Sohini M, Arup M (2012) HPLC Profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research** 4: 162-167.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003) Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 73: 43-52.

Oliveira JC (1987) Melhoramento genético. In: Ruggiero, C. (Ed.) **Cultura do Maracujazeiro**. Legis Suma, Ribeirão Preto. pp. 218-246.

Oliveira LC, Santos, Narain, Fontes AD, Campos RSS, Souza TL (2012) Characterization and extraction of volatile compounds from passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) processing waste. **Ciência Rural** 42: 2280-2287.

Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossat OM, Rota LD, Pauletti GF, Serafini LA (2003) Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13:17-22.

Park SY, Lee JG, Cho HS, Seong ES, Kim HY, Yu CY, Kim JK (2013) Metabolite profiling approach for assessing the effects of colored light-emitting diode lighting on the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer). **Plant Omics Journal** 6: 224-230.

Patel SS, Soni H, Mishra K, Singhai AK (2011) Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacological** 1: 1-16

Reginatto FH, Gosmann G, Schripsema J, Schenkel EP (2004) Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis** 15: 195–197.

Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim Pinto DL, Lani ERG, Otoni WC 24 (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: 25 *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae** 738: 425-431.

Rudnicki M, Oliveira MR, Pereira TV, Reginatto FE, Dal-Pizzol F, Moreira JC (2007) Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry** 100: 719–724.

- Saebo A, Krekling T, Applegren M (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 41: 177–185.
- Santos RP, Cruz ACF, Iarema L, Kuki KN, Otoni WC (2008) Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres** 55: 356–364.
- Santos TSF, Calixto JB, Medeiros YS (2006) Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 565-573.
- Sati SC, Sati N, Rawat U, Sati OP (2010) Medicinal plants as a source of antioxidants. **Research Journal of Phytochemistry** 4: 213-224.
- Sena LM, Zucolotto SM, Reginatto FH, Schenkel EP, De Lima TCM (2009) Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* Degener in mice: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine** 234: 976–975.
- Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G, Bórquez J E Kennelly EJ (2013) The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: A source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. **Molecules**. 18: 1672-1692.
- Tian F, Li B, Ji B, Zhang G, Luo Y (2009) Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. **LWT– Food Science and Technology** 42: 1289–1295.
- Valente A, Gonçalves TA, Sanches-Silva A, Costa HS (2011) Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International** 44: 2237–2242.
- Wagner H, Bladt S (2001) **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer. 384p.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307–313
- Yano A, Fujiwara K (2012) Plant lighting system with five wavelength-band light-emitting diodes providing photon flux density and mixing ratio control. **Plant Methods** 8: 1–12.
- Yeh N, Chung JP (2009) High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13: 2175–2180.

Yockteng R, Coppens d'Eeckenbrugge G, Souza-Chies TT (2011) *Passifloras*. In: Kole C (ed) **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, tropical and subtropical fruits**. Berlin: Springer. pp. 129-171.

Yu K-W, Murthy HN, Hahn E-J, Paek K-Y (2005) Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemical Engineering Journal** 23: 53–56.

Zeraik ML, Yariwake JH (2010) Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp. **Microchemical Journal** 96: 86–91.

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP (2012) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis** 23: 232-239.

## CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo confirmou-se que os reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, em diferentes concentrações influenciam a resposta embriogênica e modulam os padrões de formação de calo embriogênico e embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Passiflora ligularis* Juss.

A expressão do gene *SERK* usando a sonda heteróloga *pcSERK* foi observada durante a embriogênese somática, contribuindo a compreender as mudanças que ocorrem na morfogênese da espécie, possibilitando a realização de futuros trabalhos aprofundados nos aspectos bioquímicos, anatômicos e fisiológicos para *P. ligularis*.

Os embriões somáticos no estágio globular de *P. ligularis* não desenvolveram no meio de maturação (MS suplementado com carvão ativado) pelo qual será necessário continuar na busca de condições apropriadas para essa fase.

Nas condições experimentais, foi constatada a presença de orientina, vitexina, isovitexina e ácido tânico nos extratos de folhas, caules e raízes de *Passiflora mollissima*. Da mesma forma observou-se que a concentração dos flavonoides C-glicosilados foi estimulada pelos níveis de irradiância e qualidade de luz das lâmpadas diodo emissor de luz (LED) e fluorescentes (LF) utilizadas.

Os resultados sugerem que as vitroplantas de *P. mollissima* são potenciais fontes de metabólitos secundários, mostrando que o cultivo utilizando lâmpadas de LED pode ser um fator diferencial para a obtenção de metabólitos *in vitro*. Este estudo poderá auxiliar a escolha do órgão vegetativo de interesse para potencializar a produção de flavonoides e taninos para esta espécie.