

DÉBORA ALICE MOREIRA SILVA

**PERFIL HORMONAL E DINÂMICA DO STATUS OXIDATIVO DURANTE CULTIVO
in vitro DE ENDOSPERMAS DE MARACUJAZEIROS COM RESPOSTAS
MORFOGÊNICAS DIVERGENTES**

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

Orientador: Diego Ismael Rocha

Coorientadores: Cleberson Ribeiro
Wagner Campos Otoni

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586p
2024

Silva, Débora Alice Moreira, 1997-

Perfil hormonal e dinâmica do status oxidativo durante cultivo *in vitro* de endospermas de maracujazeiros com respostas morfogênicas divergentes / Débora Alice Moreira Silva. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (88 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Diego Ismael Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.640>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Passiflora edulis*. 2. *Passiflora cincinnata*. 3. Maracujá - Morfogênese. 4. Endosperma. 5. Triploides. 6. Espécies reativas de oxigênio. 7. Hormônios vegetais. 8. Organogênese vegetal. I. Rocha, Diego Ismael, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 583.626

DÉBORA ALICE MOREIRA SILVA

PERFIL HORMONAL E DINÂMICA DO STATUS OXIDATIVO DURANTE CULTIVO
in vitro DE ENDOSPERMAS DE MARACUJAZEIROS COM RESPOSTAS
MORFOGÊNICAS DIVERGENTES

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

APROVADA: 2 de setembro de 2024.

Assentimento:

Débora Alice Moreira Silva

Débora Alice Moreira Silva

Autor

Diego Rocha

Diego Ismael Rocha

Orientador

*Dedico a minha mãe,
que sempre me apoiou.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade de realizar a graduação e a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG (APQ-02581-21) e a Rede Mineira de Biotecnologia em Multiplicação e Clonagem de Plantas (RED-00225-23), pelo apoio financeiro.

À minha mãe, senhora Maria Aparecida Moreira, que me criou sozinha com mais força e coragem do que qualquer um poderia imaginar. Seu apoio aos meus sonhos e sua capacidade de me fazer acreditar que posso superar qualquer obstáculo são a verdadeira razão de eu ter chegado até aqui.

Agradeço à minha irmã Itamara, que, apesar do pouco contato no passado, tem se esforçado para fortalecer nossos laços de família. Seu carinho e apoio são inestimáveis!

Agradeço a toda minha família pelo apoio. Cada palavra de incentivo e cada gesto de carinho foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Sou muito grata por ter vocês comigo durante essa jornada.

Agradeço à Samara pelo carinho, apoio, suporte, e pelo notebook emprestado por três longos meses

Aos meus amigos, por serem apoio e por sempre estarem prontos para uma procrastinação estratégica, meus sinceros agradecimentos. E ao meu time de basquete, por me ensinarem que, assim como na quadra, na vida a persistência e o trabalho em equipe fazem toda a diferença.

Um agradecimento especial ao meu orientador Diego Ismael Rocha que me recebeu de braços abertos no laboratório de cultura de tecidos vegetais, que sempre acreditou no meu potencial e me orientou da melhor forma possível. Não posso deixar de agradecer a professora Luzimar Campos por tê-lo me apresentado.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de cultura de tecidos vegetais pelas valiosas trocas e aprendizados ao longo desta jornada.

Um agradecimento especial ao Henrique Scalco, meu estagiário que se tornou amigo, pelo apoio incansável e pela companhia durante todos os finais de semana e feriados em que trabalhamos, sem nunca saber a que horas iríamos terminar.

Agradeço à Karla, a Dora e ao José Maurício pela ajuda e pela disponibilidade, sempre prontos para colaborar.

Agradeço ao Bruno Gonçalves, cuja assistência nos experimentos e ensinamentos sobre o R foram fundamentais, e cujas playlists com músicas do fundo do baú fizeram os momentos de trabalho parecerem mais leves e agradáveis. E ao Carlos Galvan pela ajuda na revisão deste trabalho.

Agradeço ao Professor Dr. Cleberson Ribeiro e equipe do laboratório de genética e molecular de plantas, e ao professor Dr. Wagner Otoni pela coorientação, estando sempre disponíveis a ajudar e contribuir com o meu trabalho.

Agradeço ao núcleo de Microscopia e Microanálises e ao núcleo de Biomoléculas da UFV pelo suporte técnico e disposição em ajudar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Não há fim. Não há começo. Há apenas a infinita paixão pela vida.”

- Rachel Carson

RESUMO

SILVA, Débora A. M., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Perfil hormonal e dinâmica do status oxidativo durante a regeneração de gemas adventícias de maracujazeiros com respostas morfogênicas divergentes ao cultivo *in vitro* de endosperma.** Orientador: Diego Ismael Rocha. Coorientadores: Cleberson Ribeiro e Wagner Campos Otoni.

Passiflora edulis Sims e *P. cincinnata* Mast. são espécies de maracujazeiros que apresentam respostas morfogênicas temporalmente divergentes ao longo do cultivo *in vitro* de endospermas. Embora existam protocolos bem estabelecidos para ambas as espécies, os processos fisiológicos que regulam essas respostas ainda são pouco compreendidos. Este estudo teve como objetivo caracterizar a morfoanatomia, a dinâmica do status oxidativo e o perfil hormonal de *P. edulis* e *P. cincinnata* durante a regeneração de gemas adventícias, buscando entender as diferenças estruturais e bioquímicas entre as espécies. Endospermas de ambas espécies foram desinfestados e inoculados em meio de indução de organogênese, suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de tidiazuron para *P. edulis* e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de benziladenina para *P. cincinnata* e cultivados em sala de crescimento a $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Amostras foram coletadas pré-cultivo e após 5, 15 e 30 dias de cultivo. Inicialmente, os explantes eram brancos com células isodiamétricas. Aos 5 dias, *P. cincinnata* começou a formar calos e apresentou coloração esverdeada, características ausentes em *P. edulis*. Aos 30 dias, *P. cincinnata* já exibia gemas adventícias diferenciadas, enquanto *P. edulis* ainda não havia desenvolvido estruturas organogênicas bem definidas. Interessantemente, *P. edulis* apresentou níveis mais altos de MDA durante todo o processo, enquanto *P. cincinnata* não apresentou MDA aos 5 dias. O conteúdo de H_2O_2 em *P. cincinnata* diminuiu aos 5 dias e permaneceu significativamente menor do que em *P. edulis*. A produção de $\text{O}_2^{\cdot -}$ também foi menor em *P. cincinnata*. As atividades das enzimas antioxidantes POX, APX e SOD variaram entre as espécies, com *P. cincinnata* apresentando um aumento crescente dessas atividades ao longo do processo regenerativo. Quanto ao perfil hormonal, ambas as espécies mostram redução de IAA ao longo das fases. Em *P. cincinnata*, houve aumento na concentração de ACC, ZEA e BRA durante a fase de determinação, enquanto *P. edulis* teve maior atividade de SA na fase inicial em relação a *P. cincinnata* e de JA durante a fase de determinação. MeJa e ABA permaneceram estáveis em ambas as espécies. Os resultados sugerem

que diferenças na produção de EROs, na atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo e fitormônios podem estar associadas à diferença espaço-temporal observada no cultivo *in vitro* de endospermas de *P. edulis* e *P. cincinnata*.

Palavras-chave: Espécies Reativas de Oxigênio. Hormônios vegetais. Organogênese *de novo*. Triploides.

ABSTRACT

SILVA, Débora A. M., M.Sc., Federal University of Viçosa, July 2024. **Hormonal profile and oxidative status dynamics during the regeneration of adventitious buds in passion fruit plants with divergent morphogenic responses to *in vitro* endosperm culture.** Advisor: Diego Ismael Rocha. Co-advisors: Cleberson Ribeiro and Wagner Campos Otoni.

Passiflora edulis Sims and *P. cincinnata* Mast. are passionfruit species that exhibit temporally divergent morphogenic responses during *in vitro* endosperm cultivation. Although well-established protocols exist for both species, the physiological processes regulating these responses remain poorly understood. This study aimed to characterize the morpho-anatomy, oxidative status dynamics and the hormonal profile of *P. edulis* and *P. cincinnata* during the regeneration of adventitious buds, seeking to understand the structural and biochemical differences between the species. Endosperms from both species were disinfected and inoculated in organogenesis induction medium, supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ of thidiazuron for *P. edulis* and 2.0 mg·L⁻¹ of benzyladenine for *P. cincinnata*, and cultivated in a growth room at 27 ± 2 °C. Samples were collected pre-cultivation and after 5, 15, and 30 days of cultivation. Initially, the explants were white with isodiametric cells. At 5 days, *P. cincinnata* began to form calluses and exhibited a greenish coloration, characteristics absent in *P. edulis*. By 30 days, *P. cincinnata* already displayed differentiated adventitious buds, while *P. edulis* had not yet developed well-defined organogenic structures. Interestingly, *P. edulis* showed higher levels of MDA throughout the process, whereas *P. cincinnata* exhibited no MDA at 5 days. The H₂O₂ content in *P. cincinnata* decreased at 5 days and remained significantly lower than in *P. edulis*. The production of O₂•⁻ was also lower in *P. cincinnata*. The activities of the antioxidant enzymes POX, APX, and SOD varied between the species, with *P. cincinnata* showing a continuous increase in these activities throughout the regenerative process. Regarding the hormonal profile, both species showed a reduction in IAA throughout the phases. In *P. cincinnata*, there was an increase in ACC, ZEA, and BRA concentrations during the determination phase, while *P. edulis* exhibited higher SA activity in the initial phase compared to *P. cincinnata* and higher JA activity during the determination phase. MeJA and ABA remained stable in both species. The results suggest that differences in ROS production, antioxidant enzyme activity, and phytohormones may be associated with

the spatiotemporal differences observed in the in vitro cultivation of *P. edulis* and *P. cincinnata* endosperms.

Keywords: Reactive Oxygen Species. Plant hormones. Bibliometric analyses. *De novo* organogenesis. Triploids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO I	24
CULTIVO <i>in vitro</i> DE ENDOSPERMA: FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA PARA A PRODUÇÃO DIRETA DE PLANTAS TRIPLOIDES	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Busca de dados	25
2.3 Filtragem dos dados obtidos	25
2.4 Análise de Dados	26
3. RESULTADOS	27
3.1 Cultura <i>in vitro</i> de endosperma	27
3.2 Análise da produção literária.....	40
3.3 Países e afiliações com maior produção científica.....	41
3.4 Revistas mais relevantes	42
3.5 Autores de maior relevância.....	43
3.6 Documentos mais citados	44
3.7 Co-ocorrência de termos e palavras	46
4 DISCUSSÃO.....	47
5 REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO II	52
PERFIL HORMONAL E DINÂMICA DO STATUS OXIDATIVO DURANTE CULTIVO <i>in vitro</i> DE ENDOSPERMAS DE MARACUJAZEIROS COM RESPOSTAS MORFOGÊNICAS DIVERGENTES	52
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Material vegetal.....	55
2.2 Organogênese <i>de novo</i> a partir do cultivo de endosperma.....	55
2.3 Coleta do Material	56
2.4 Imagens de Lupa	56
2.5 Microscopia de luz	56
2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	57
2.7 Determinação do teor de ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA)	57

2.8 Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes.....	58
2.9 Determinação do perfil hormonal	59
2.10 Análise dos dados	60
3. RESULTADOS	60
3.1 Regeneração via organogênese <i>de novo</i> e aspectos anatômicos	60
3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	62
3.3 Mudanças citológicas e estruturais das células dos endospermas durante a indução da organogênese <i>de novo</i>	64
3.4 Conteúdo de EROs e metabolismo antioxidante.....	66
3.5 Perfil hormonal de explantes organogênicos durante a organogênese <i>de novo</i>	70
4 DISCUSSÃO.....	72
4.1 Endosperma derivado de <i>P. cincinnata</i> apresentou maior avanço na regeneração <i>in vitro</i> em comparação a <i>P. edulis</i>	72
4.2 Elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio indicam maior estresse oxidativo em <i>P. edulis</i> , contrastando com <i>P. cincinnata</i> , que exibe adaptação mais rápida ao longo das fases de regeneração	73
4.3 Diferenças na concentração de hormônios vegetais influenciam a eficiência de regeneração em <i>P. edulis</i> e <i>P. cincinnata</i> durante as fases de regeneração <i>in vitro</i> a partir do endosperma	76
5 CONCLUSÃO	79
6 REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas como organismos sésseis, enfrentam diversos desafios abióticos. Com isso, a capacidade regenerativa das plantas tem papel crucial para manter sua sobrevivência (Birnbaum 2008). A regeneração vegetal é um processo fisiológico que envolve a aquisição de competência, reprogramação celular e a reorganização espacial de identidades celulares e pode ocorrer ao longo do ciclo de vida das plantas (Mathew et al., 2024). No contexto da biotecnologia vegetal, a regeneração de plantas *in vitro* desempenha papel fundamental, permitindo a produção em larga escala de espécies de interesse agrônomo, a sofisticação das práticas de clonagem e a manipulação genética de plantas a partir de tecidos vegetais em condições controladas de laboratório (Zhuravlev e Omelko, 2008, Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo, 2016).

Uma das estratégias mais utilizadas para a regeneração de plantas *in vitro* é a organogênese *de novo*, que se dá pela formação de meristemas temporalmente e espacialmente separados, em padrão monopolar. A partir da formação de um dos meristemas, pode haver renovação e diferenciação em tecidos e órgãos (Sang et al., 2018). Skoog e Miller (1957), pioneiros na aplicação da organogênese *de novo*, revelaram que durante o cultivo *in vitro* a proporção exógena entre os hormônios vegetais citocinina e auxina, determina o tipo de órgão regenerado. Uma alta proporção de citocinina:auxina induz a formação do meristema caulinar, enquanto uma baixa razão de citocinina:auxina resulta no desenvolvimento de raízes. A partir disso, foram estabelecidos sistemas de regeneração *in vitro* para diversas espécies de plantas com finalidades como a propagação em massa e transformação genética (Kareem et al., 2016; Raspor et al., 2021).

Sistemas de regeneração *in vitro* têm sido estabelecidos a partir de diferentes tecidos e/ou órgãos vegetais. O endosperma tem se destacado como um explante de interesse para a regeneração de plantas devido à sua capacidade única de possibilitar a regeneração de plantas triploides (Tang et al., 2024). O endosperma é um tecido de reserva de nutrientes em sementes da maioria das angiospermas. Sua formação ocorre pela fusão de um núcleo haploide espermático com os dois núcleos da célula central do saco embrionário, resultando em um tecido triploide (Doll e Nowack, 2024; Friedman, 2001).

A importância do endosperma na regeneração de plantas reside na sua capacidade de fornecer um ambiente nutricionalmente rico que suporta o desenvolvimento de tecidos regenerativos e a formação de novas plantas. Além disso, por ser triploide, o endosperma permite a obtenção direta de plantas triploides, que são de interesse particular na pesquisa e na biotecnologia devido às suas características agronomicamente desejáveis, como maior vigor e maior resistência a doenças (Wang et al., 2016). O potencial promissor do endosperma para a regeneração de plantas é reforçado por sua capacidade de ser manipulado em cultivo *in vitro* para gerar variedades melhoradas de plantas, ampliando as aplicações no melhoramento genético e na produção de novas cultivares (Thomas & Chatuverdi, 2008; Sun et al., 2011).

Estudos recentes têm mostrado que o endosperma pode ser uma fonte valiosa para a produção de plantas com características específicas, aproveitando suas propriedades únicas para otimizar processos de cultivo e regeneração. Esses avanços destacam a relevância crescente do endosperma como uma ferramenta poderosa na biotecnologia vegetal e na agricultura moderna (Kumar & Gupta 2015; Hoshino et al., 2011).

O gênero *Passiflora* compreende a mais de 500 espécies amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais. Seus frutos são popularmente conhecidos como maracujá, sendo o gênero reconhecido como o maior da família Passifloraceae (Acha et al., 2021, MacDougal et al., 2004). O mercado global de maracujá movimenta mais de um milhão de toneladas da fruta, sendo o Brasil o maior exportador (Anderson et al., 2022). Essas plantas são valorizadas não apenas por seus frutos, mas também por suas propriedades medicinais, compostos bioativos, potencial ornamental e biotecnológico (Pereira et al., 2023; Maldonado et al., 2023).

Atualmente, sistemas de regeneração *in vitro* a partir do cultivo de endosperma foram estabelecidos para diferentes espécies maracujazeiros, como *Passiflora edulis* Sims (Antoniuzzi et al., 2018), espécie de maior interesse comercial do gênero, e para *P. cincinnata* Mast. (Silva et al., 2020), espécie silvestre com potencial ornamental. Segundo os autores, em ambas as espécies, a triploidia das plantas regeneradas foi confirmada. As técnicas de regeneração *in vitro* têm sido amplamente empregadas em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de plantas, oferecendo uma maneira eficiente de propagar plantas com características desejáveis (Pinto et al., 2022). No entanto, é importante ressaltar que nem todas as espécies

respondem igualmente bem ao cultivo *in vitro*. Algumas espécies, como *Passiflora edulis*, apresentam diferença espaço-temporal durante o processo de regeneração *in vitro* quando comparado a outras espécies como *Passiflora cincinnata* (Dias et al., 2009; da Silva et al., 2011).

Um dos principais fatores envolvidos na determinação e na competência organogênica de um explante é o nível de hormônios endógenos (Thompson et al., 2000), o que torna a compreensão desses mecanismos fisiológicos essencial. Os hormônios endógenos atuam como sinalizadores moleculares que induzem a organogênese *de novo* através da mediação da cascata de transdução de sinais, levando à reprogramação da expressão gênica (Elhiti et al., 2013). A concentração desses hormônios pode ser afetada por diversos fatores, como a aplicação de reguladores de crescimento, que podem interagir e alterar a concentração endógena (Gutiérrez et al., 2013), e o corte do explante (Thornburg & Li, 1991; Yang et al., 2012), que aciona sinais para o processo regenerativo (Iwase et al., 2011; Chen et al., 2016).

A regeneração de tecidos em certos eucariotos também têm sido associada ao metabolismo das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gauron *et al.*, 2013, Love et al., 2013). As EROs são quaisquer moléculas derivadas do oxigênio (O_2) que são mais reativas do que o próprio O_2 (Waszczak et al., 2018). A concentração e o tipo de EROs são determinantes para o tipo de resposta morfogênica. As EROs em baixa concentração são capazes de induzir respostas adaptativas e a transcrição de genes de defesa, enquanto que em alta concentração desencadeiam um programa de morte celular geneticamente controlado (Breusegem & Dat, 2006). Contudo, a dinâmica de sinalização de EROs no cultivo *in vitro* de endospermas é desconhecida. Entre as EROs mais estudadas estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Hernandez et al., 2001). Essas espécies reativas de oxigênio são produzidas como subprodutos do metabolismo celular e embora possam causar danos às células, a sua presença também pode estar relacionada com a sinalização de processos celulares essenciais e com a reprogramação e regeneração de gemas adventícias em culturas de plantas *in vitro* (Apel & Hirt, 2004). O H_2O_2 , uma molécula relativamente estável e com capacidade de difusão através das membranas celulares, é uma molécula adequada para atuar na sinalização celular (Wei et al., 2024).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é um radical livre gerado pelo metabolismo do oxigênio molecular no organismo e pode ser convertido em H_2O_2 (Torres & Dangl, 2005). A NADPH oxidase (NOX), localizada na membrana plasmática, transfere

elétrons do NADPH para o oxigênio, formando $O_2^{\cdot-}$. Este, por sua vez, é convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Neill et al., 2002; Jiang & Zhang, 2002).

Em resposta aos efeitos adversos das EROs e afim de manter o equilíbrio redox celular, enzimas como a ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX) e SOD atuam na proteção das células contra danos oxidativos, catalisando a decomposição de EROs e impedindo a propagação de reações em cadeia de radicais livres (Caverzan et al., 2016).

A APX é uma enzima chave no ciclo dos ascorbatos, um importante mecanismo antioxidante nas plantas. Sua principal função é catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) usando ascorbato como doador de elétrons (Panday et al., 2017). A APX ajuda a controlar os níveis de H_2O_2 nas células, evitando que se acumulem e causem danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Esta enzima é encontrada em diferentes compartimentos celulares, incluindo o citosol, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Zhang et al., 2023).

A CAT é uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio, produzindo oxigênio e água molecular (Chelikani et al., 2004). A CAT possui uma das maiores taxas catalíticas conhecidas pela biologia, ela controla a concentração de H_2O_2 e é considerada uma das enzimas chave do metabolismo antioxidantes com papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo, especialmente em situações onde há uma rápida produção de H_2O_2 (Baker et. al 2023).

POX são um grupo de enzimas que catalisam a oxidação de substratos específicos utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Panday et al., 2017). Estudos mostraram que as peroxidases podem ser úteis no desenvolvimento de plantas transgênicas com maior tolerância a múltiplos estresses (Kidwai et al., 2020). Existem vários tipos de peroxidases, incluindo a Glucadiona Peroxidase (GPX) e a Ascorbato Peroxidase (APX) (Akbulak et al., 2018). As POX formam grandes famílias multigênicas e estão envolvidos no metabolismo de EROs, na síntese e degradação de hormônios, no desenvolvimento de frutos, na síntese, defesa e manutenção da parede celular (Freitas et al., 2024). Elas ajudam a remover H_2O_2 e a proteger as células de danos oxidativos. Estas enzimas podem ser encontradas em diferentes partes da célula, incluindo a parede celular, vacúolos e o citoplasma (Hiraga et al., 2001).

As SOD têm como principal função a proteção contra o acúmulo de EROs através da eliminação de $O_2^{\cdot -}$. Nesse processo, as SODs geram outra forma de EROs menos reativa, o H_2O_2 . Com isso, o principal papel das SODs é limitar o acúmulo e difusão de $O_2^{\cdot -}$, prevenindo danos oxidativos e contribuindo para a regulação redox celular (Karpinska & Foyer 2024). As classes SOD estão localizadas em vários compartimentos celulares nas células das plantas. Em *Arabidopsis*, a Cu/Zn-SOD está presente no cloroplasto, onde neutraliza radicais superóxido que surgem durante a fotossíntese, respiração e estresse ambiental. A Mn-SOD é encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos, onde protege o DNA mitocondrial e proteínas contra danos causados por radicais superóxido gerados na cadeia de transporte de elétrons. A Fe-SOD também está presente nos cloroplastos, desintoxicando os radicais superóxido formados nos complexos do Fotossistema I e II. Adicionalmente, existe uma Cu/Zn-SOD extracelular no apoplasto, que defende a membrana celular contra danos oxidativos e auxilia no desenvolvimento da parede celular da planta (Alscher et al., 2002; Marques et al., 2014; Mishra & Sharma 2019; Zhou et al., 2022).

O Malondialdeído (MDA) é um composto orgânico que é formado pela degradação dos ácidos graxos poli-insaturados durante o processo de peroxidação lipídica. É um marcador muito utilizado em estudos que abordam estresse oxidativo e sinalização redox (Wang et al., 2023). A peroxidação lipídica é um processo pelo qual um radical livre, como o radical hidroxila ($\cdot OH$), reage com um ácido graxo poli-insaturado na membrana celular, formando um radical lipídico ($L^{\cdot}$). Este radical lipídico pode reagir com o oxigênio molecular, criando um radical peroxil ($LOO^{\cdot}$). O radical peroxil pode então continuar a reagir com outros ácidos graxos, perpetuando uma cadeia de reações em cascata que resultam em danos extensivos aos lipídios de membrana (Ayala et al., 2014). A peroxidação lipídica resulta em vários produtos, incluindo hidroperóxidos lipídicos e aldeídos reativos como o MDA. Esses produtos podem causar disfunção nas membranas celulares, alterando sua fluidez, permeabilidade e capacidade de funcionar corretamente. Além disso, os produtos de peroxidação lipídica podem reagir com proteínas e DNA, causando danos adicionais e contribuindo para diversas patologias (Alchér, 2019).

O presente estudo tem como objetivo investigar a dinâmica do status oxidativo e o perfil hormonal durante a regeneração de gemas adventícias a partir do endosperma de duas espécies filogeneticamente próximas com respostas morfogênicas divergentes ao cultivo *in vitro*, sendo elas: *Passiflora edulis* e *P.*

cinnata. Para alcançar esse objetivo, foram realizadas análises microscópicas e bioquímicas, a fim de determinar a dinâmica de concentração de espécies reativas de oxigênio, as atividades de enzimas do estresse antioxidativo e o conteúdo de hormônios endógenos ao longo do processo de regeneração *in vitro*, de ambas as espécies estudadas. Além disso, esse trabalho também se dedicou a investigar a extensão e as tendências da pesquisa sobre regeneração de plantas triploides a partir do endosperma *in vitro*. Para isso, o presente documento foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo, intitulado “Cultivo *in vitro* de endospermas: revisão teórica e análise bibliométrica”, e o segundo capítulo intitulado: “Perfil hormonal e dinâmica do status oxidativo durante cultivo *in vitro* de endospermas de maracujazeiros com respostas morfogênicas divergentes”.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, S., Linan, A., MacDougal, J., Edwards, C., (2021). **The evolutionary history of vines in a neotropical biodiversity hotspot: phylogenomics and biogeography of a large passion flower clade (*Passiflora* section *Decaloba*)**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 164:107260. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107260>
- Akbudak, M. A., Filiz, E., Vatansever, R., & Kontbay, K. (2018). **Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.)**. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 925-936.
- Alché, J.D., (2019). **A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants**. *Redox Biology*, Volume 23, 101136, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). **Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants**. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Anderson, J.D., Vidal, R.F., Brym, M. et al., (2022). **Genotyping-by-sequencing of passion fruit (*Passiflora* spp.) generates genomic resources for breeding and systematics**. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69, 2769–2786 <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01397-4>

- Antoniuzzi, C. A, Faria, R. B, Carvalho, P.P., Mikovski, A. I., Carvalho, I. F., Matos, E. M., Reis, A.C., Viccini, L.F., Pinto, D. L. P., Rocha, D.I., Otoni, W.C., Silva, M.L., (2018). ***In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims).** *Sci Hortic* 238: 408-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.001>.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.** *Annual Review Plant Biology*, 55(1), 373-399.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014). **Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Birnbaum, K. D.; Sanchez Alvarado, A. (2008). **Slicing across kingdoms: Regeneration in plants and animals.** *Cell*, 132, 697–710.
- Breusegem, F. V.; Dat, J.F. (2006). **Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death.** *Plant Physiology*. 141, 384–390.
- Caverzan, A., Casassola, A., Patussi Brammer, S. (2016). **Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress.** *InTech*. doi: 10.5772/61368
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). **Diversity of structures and properties among catalases.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.
- Chen, D., Melton, L.D., Zujovic, Z., Harris, P. J., (2019) **Developmental changes in collenchyma cell-wall polysaccharides in celery (*Apium graveolens* L.) petioles.** *BMC Plant Biology*, v. 19, n. 1, p. 1–19.
- da Silva, N.T., Silva, L.A.S., Reis, A.C. *et al.*, (2020). **Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 142, 613–624. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-020-01887-2>.
- Dias, L.L.C, Santa-Catarina C., Ribeiro D.M., Barros R.S., Floh E.I.S., Otoni W.C., (2009) **Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor.** *Plant Cell Tissue Organ Culture* 99(2):199–208. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9594-y>

- Doll, N. M., Nowack, M. K. (2024) **Endosperm cell death: roles and regulation in angiosperms**, *Journal of Experimental Botany*, 2024;, erae052, <https://doi.org/10.1093/jxb/erae052>
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A., (2013) **Molecular regulation of plant somatic embryogenesis**. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49:631–642. doi:10.1007/s11627-013-9547-3.
- Freitas, C.D.T., Costa, J.H., Germano, T.A., Rocha, R. O., Ramos, M.V., Bezerra, L.P., (2024). **Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions**, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 263, Part 1, 130306, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130306>.
- Friedman, W. E., (2001). **Developmental and evolutionary hypotheses for the origin of double fertilization and endosperm**. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, Volume 324, Issue 6, Pages 559-567, ISSN 0764-4469, [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01326-9](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01326-9).
- Gauron, C., Rampon, C., Bouzaffour, M., Ipendey, E., Teillon, J., Volovitch, M., Vríz, S., (2013). **Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed**. *Scientific Reports* 3, 2084.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). **A large family of class III plant peroxidases**. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Hoshino, Y., Miyashita, T., & Thomas, T. D. (2011). **In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: approaches to polyploidy breeding**. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 1-8.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., & Ohme-Takagi, M. (2011). **The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis**. *Current Biology*, 21(7), 508-514. doi:10.1016/j.cub.2011.02.020
- Jiang, M., Zhang, J., (2002) **Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygenspecies and up-regulates the activities of antioxidant enzymesin maize leaves**. *Journal of Experimental Botany*, 53:2401–2410. doi:10.1093/jxb/erf090.
- Kidwai, M., Ahmad, I. Z., & Chakrabarty, D. (2020). **Class III peroxidase: An indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement**. *Plant Cell Reports*, 39(11), 1381-1393.

- 270 Kumar, A., & Gupta, N. (2015). **Applications of triploids in agriculture.** *Plant Biology*
 271 *and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*, 385-396.
- 272 Love, N.R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., Gallop, J. L.,
 273 Dorey, K., Amaya, E., (2013). **Amputation-induced reactive oxygen species**
 274 **are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration.** *Nature Cell*
 275 *Biology* 15, 222–228.
- 276 Maldonado, J. F. M., Gallo, A. S. D., Molano, A. S., Rodríguez, A. M. P., Costa, G. M.,
 277 Ariza, L. A. D., (2023). **Efecto de factores bióticos y abióticos en el contenido**
 278 **de flavonoides en hojas de *Passiflora* sp. L.: Una revisión sistemática.**
 279 Scientia Agropecuaria, 14(4), 465-478. Facultad de
 280 Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Trujillo
- 281 Marques, A. T., Santos, S. P., Rosa, M. G., Rodrigues, M. A., Abreu, I. A., Frazao, C.,
 282 & Romão, C. V. (2014). **Expression, purification and crystallization of**
 283 **MnSOD from *Arabidopsis thaliana*.** *Acta Crystallographica Section F:*
 284 *Structural Biology Communications*, 70(5), 669-672.
- 285 Mathew, M.M., Ganguly, A. and Prasad, K., (2024). **Multiple feedbacks on self-**
 286 **organized morphogenesis during plant regeneration.** *New Phytol*, 241: 553-
 287 559. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/nph.19412>
- 288 Mishra, P., Sharma, P., (2019). **Superoxide dismutases (SODs) and their role in**
 289 **regulating abiotic stress induced oxidative stress in plants. In book:**
 290 **Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants.** DOI:
 291 10.1002/9781119468677.ch3
- 292 Neill, S., Desikan, R., Hancock, J., (2002). **Hydrogen peroxide signaling.** *Curr Opin*
 293 *Plant Biol.*;5:388–395. doi:10.1016/S1369-5266(02)00282-0.12.
- 294 Pereira, Z. C., Cruz, J. M. A., Corrêa, R. F., Sanches, E. A., et al., (2023). **Passion**
 295 **fruit (*Passiflora* spp.) pulp: A review on bioactive properties, health benefits**
 296 **and technological potential,** *Food Research International*, Volume 166,
 297 112626, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112626>.
- 298 Pinto, G.H.T., Lopes, A.A., de Freitas Morel, L.J. et al., (2022). **Genetic diversity**
 299 **among genotypes of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel. maintained in an**
 300 *in vitro* germplasm bank. 3 *Biotech* 12, 8. [https://doi-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13205-021-03016-y)
 301 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13205-021-03016-y](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13205-021-03016-y)

- Sang, Y. L., Cheng, Z. J., Zhang, X. S., (2018), **Plant stem cells and *de novo* organogenesis.** New Phytol, 218: 1334-1339. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/nph.15106>
- Skoog, F. and Miller, C. O., (1957) **Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured *in Vitro*.** Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, 118-131.
- Sun, D.Q., Lu, X.H., Liang, G.L. et al., (2011). **Production of triploid plants of papaya by endosperm culture.** Plant Cell Tiss Organ Cult 104, 23–29 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9795-4>
- Tang. J., Luo, X., Zhu, Y., Cai, N., Chen, L., Chen. S., Xu, Y., (2024). ***In vitro* regeneration of triploid from mature endosperm culture of *Passiflora edulis* “Mantianxing”**, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 88, Issue 4, Pages 412–419, <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae009>
- Thomas, T.D., Chaturvedi, R., (2008). **Endosperm culture: a novel method for triploid plant production.** Plant Cell Tiss Organ Cult 93, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A. and Taylor, I.B. (2000a) **Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid.** Plant Mol. Biol. 42: 833–845.
- Thornburg, R. W, Li, X. (1991) **Wounding *Nicotiana tabacum* leaves causes a decline in endogenous indole-3-acetic acid.** Plant Physiol 96:802–805. [doi:10.1104/pp.96.3.802](https://doi.org/10.1104/pp.96.3.802)
- Torres, M. A., Dangel, J. L., (2005) **Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development.** Curr Opin Plant Biol.;8(4):397–403. [doi:10.1016/j.pbi.2005.05.014](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.014).
- Loyola-Vargas, V. M.; Ochoa-Alejo, N., (2016). **Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications.** p. 1–506.
- Ulmer, T., Mac Dougal, J.M. (2004). **Systematics.** In *Passiflora: Passionflowers of the World*, Timber Press, Portland, USA; pp. 27–31.
- Wang, P., Liu, W., Han, C., Wang, S., Bai, M., Song, C. (2023). **Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development.** Journal of Integrative Plant Biology. Volume 66, Issue 3, Pages 330-367. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jipb.13601>

- Wang, X., Cheng, Z-M., Zhi, S., Xu, F., (2016). **Breeding triploid plants: a review.** Czech J Genet Plant 52:41–54. <https://doi.org/10.17221/151/2015-CJGPB>
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J. (2018). **Reactive oxygen species in plant signaling.** *Annual Review of Plant Biology*. 69: 209–236.
- Wei, T. L., Guo, D., Pei, M. S., Wang, Z. H., Liu, H. N., Yu, Y. H. (2024). **Hydrogen peroxide promotes potassium uptake by activating flavonoid biosynthesis pathway and ethylene signaling in grapevines,** *Scientia Horticulturae*, Volume 326, 112728, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112728>
- Yang, X.; Zhang, X. (2010) **Regulation of somatic embryogenesis in higher plants.** *Critical Reviews in Plant Science*, v. 29, n. 1, p. 36-57.
- Zhang, B., Lewis, J. A., Vermerris, W., Sattler, E., Kang, C. (2023). **A sorghum ascorbate peroxidase with four binding sites has activity against ascorbate and phenylpropanoids,** *Plant Physiology*, Volume 192, Issue 1, May 2023, Pages 102–118, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac604>
- Zhuravlev, Y.N., Omelko, A.M. (2008). **Plant morphogenesis *in vitro*.** *Russian Journal of Plant Physiology*. 55,579–596 <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1134/S1021443708050014>.

CAPÍTULO I

CULTIVO *in vitro* DE ENDOSPERMA: FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA PARA A PRODUÇÃO DIRETA DE PLANTAS TRIPLOIDES

1. INTRODUÇÃO

A triploidia é uma característica genética promissora para o desenvolvimento de cultivares com maior adaptabilidade e/ou rendimento em programas de melhoramento de plantas, (Osborn et al., 2003). Triploides podem ser encontrados naturalmente no ambiente ou podem ser obtidos por meio do cultivo *in vitro* de endosperma, que proporciona uma abordagem prática e direta para a regeneração de plantas triploides. A manipulação da poliploidia tem sido uma ferramenta crucial na biotecnologia vegetal, permitindo a obtenção de variedades com características superiores que são de grande interesse para a agricultura (Renny-Byfield & Wendel, 2014).

A regeneração *in vitro* a partir de endosperma pode ocorrer via organogênese *de novo*, onde novos órgãos são formados diretamente a partir dos tecidos, ou através de embriogênese somática, onde células somáticas se desenvolvem em embriões somáticos que podem dar origem a plantas completas. Essa abordagem tem sido utilizada para a produção de plantas triploides em várias espécies vegetais, proporcionando uma via eficiente para o desenvolvimento de cultivares com características desejáveis (Ochatt et al., 2008). O cultivo *in vitro* de endosperma começou na década de 1930 com milho e desde então se expandiu para aproximadamente 60 espécies. Nos últimos anos, foram feitos avanços significativos na geração de plantas triplóides através da regeneração de endospermas, abrangendo diversas espécies como *Allium hirtifolium* (Jahanian et. al, 2024), *Melia azedazach* (Thang 2018), *Actinidia kolomikta* (Asakura & Hoshino 2017) e *Passiflora edulis* (Antoniazzi et al., 2018).

Para compreender a extensão e as tendências da pesquisa sobre regeneração de plantas triploides a partir do endosperma *in vitro*, no presente estudo é apresentada uma análise bibliométrica a fim de mapear a produção científica nesta área. O objetivo desta revisão bibliométrica é identificar os principais temas abordados, os autores e países mais influentes, bem como os periódicos de maior impacto, fornecendo uma base sólida para futuras investigações. Essa abordagem bibliométrica busca oferecer uma visão detalhada do panorama atual da pesquisa sobre o cultivo *in vitro* de

endosperma, e além disso, identificar lacunas e oportunidades para futuras investigações, contribuindo para o avanço do conhecimento e aplicações práticas na biotecnologia vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Busca de dados

Foram utilizadas três bases de dados para obter os trabalhos analisados na bibliometria: Scopus, Web of Science e Google Scholar. Os seguintes termos foram aplicados como filtros para identificar estudos sobre o uso de endosperma na cultura de tecidos vegetais: (*endosperm* AND "*plant regeneration*") OR (*endosperm* AND "*callus induction*") OR (*endosperm* AND "*somatic embryogenesis*") OR (*endosperm* AND *organogenesis*) OR (*endosperm* AND "*shoot organogenesis*") OR ("*endosperm*" AND *triploid*). Foram considerados diversos tipos de publicações, incluindo artigos científicos, livros, capítulos de livros, artigos de conferências, notas, revisões, anais de conferências e notas técnicas. Além disso, artigos mencionados em outros estudos foram incorporados, a fim de assegurar uma cobertura abrangente e representativa da literatura disponível sobre o tema. Todos os dados coletados foram salvos no formato BibTex para análise bibliométrica subsequente utilizando o pacote bibliometrix no software R.

2.3 Filtragem dos dados obtidos

O processo de filtragem envolveu a seleção rigorosa de recursos, garantindo que apenas os trabalhos mais relevantes fossem incluídos na análise bibliométrica. Os critérios adotados exigiam que os estudos fossem diretamente relacionados à cultura de endosperma, com a exclusão de pesquisas focadas em cultura de cotilédones ou cultura de embriões. Também foram excluídos estudos que abordavam a regeneração suportada por endosperma, mas que utilizavam apenas o embrião como base, sem formação de calos de endosperma. A exclusão de trabalhos foi realizada a partir da análise do título (remoção de 76 trabalhos), resumo (remoção de 177 trabalhos) ou corpo do texto (remoção de 83 trabalhos), sempre que ficou evidente que o foco do estudo não estava na cultura de endosperma, mas em tecidos ou processos relacionados, como cotilédones ou embriões, que não atendiam ao escopo específico desta pesquisa. A remoção de estudos duplicados, total de 155 trabalhos,

foi realizada utilizando o pacote bibliometrix no software R. Após a filtragem, foi obtido um total de 207 trabalhos que foram analisados nesse estudo bibliométrico (Fig. 1).

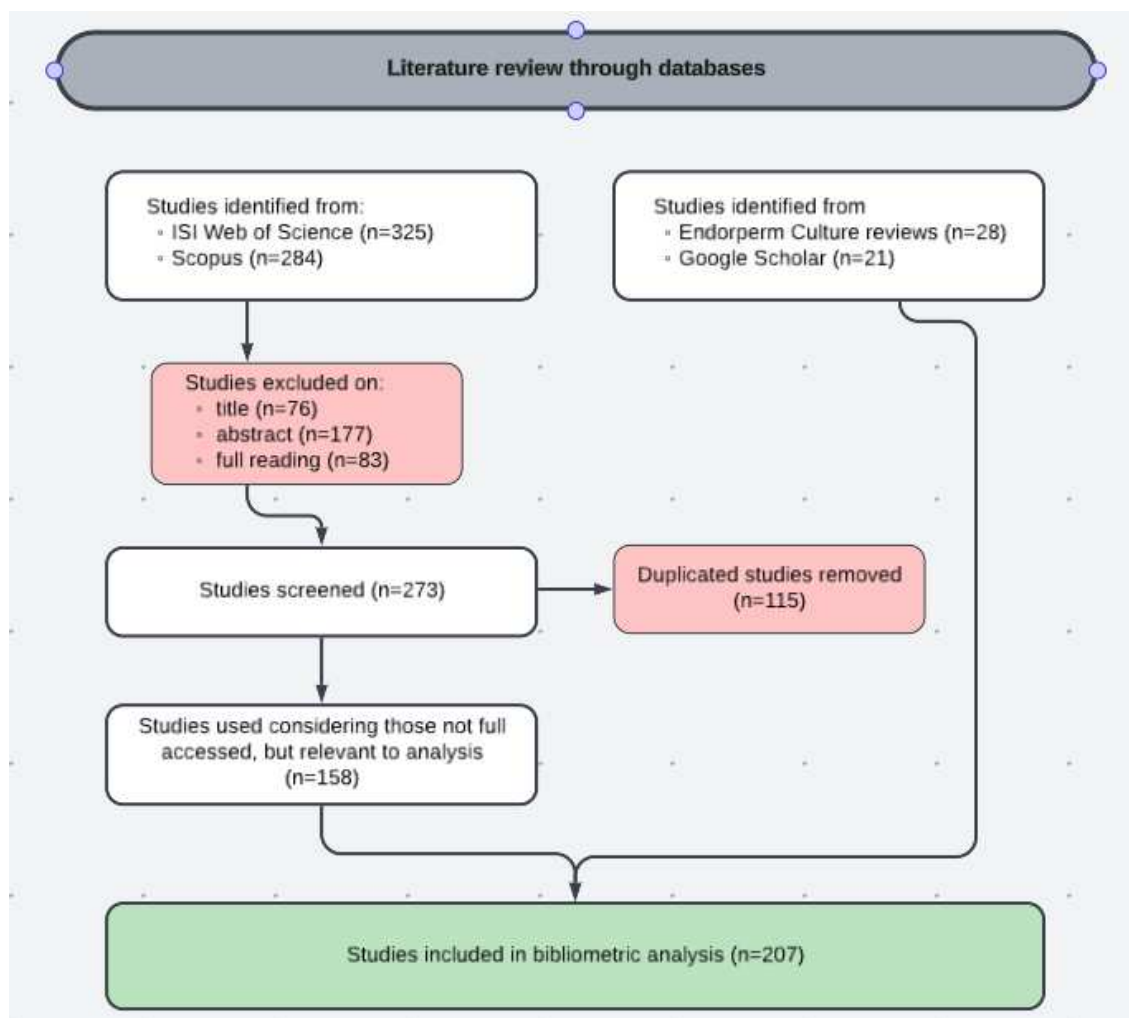


Figura 1: Processo de filtragem dos dados obtidos a partir das três bases de dados utilizadas: Web of Science, Scopus e Google Scholar. Após obtenção dos dados, trabalhos não relacionados ao cultivo de endosperma *in vitro* foram removidos. Os dados restantes foram utilizados para a realização da análise bibliométrica.

2.4 Análise de Dados

Para a análise dos trabalhos obtidos, definimos parâmetros específicos, como a frequência de palavras ao longo do tempo, identificação das palavras mais relevantes nos dados extraídos, autores que mais publicam ao longo do tempo, entre outros, com o objetivo de identificar padrões e tendências de pesquisa. Foi utilizado o pacote Bibliometrix (Aria & Cuccurullo, 2017) no software R (R Core Team, 2024) para a análise quantitativa e o software VOSviewer para gerar mapas baseados em redes bibliométricas, quantificando e correlacionando a produção científica. Vale destacar

que a análise foi fundamentada nas informações com menor número de dados ausentes, assegurando assim a confiabilidade das fontes utilizadas.

3. RESULTADOS

3.1 Cultura *in vitro* de endosperma

Após a triagem, que seguiu critérios rigorosos de inclusão e exclusão, 207 trabalhos foram analisados, publicados em 95 fontes diferentes, incluindo principalmente artigos (144 no total), além de revistas, jornais, livros, revisões, artigos de procedimento, artigos de conferência, notas e cartas.

As primeiras tentativas de cultura *in vitro* de endosperma ocorreram na década de 1930, usando endosperma de milho em um meio fortificado com extratos de batatas e grãos imaturos de milho (Lampe & Mills 1936). Posteriormente, vários laboratórios de pesquisa iniciaram seus estudos com esse tecido (Straus & La Rue 1954; Tamaoki & Ullstrup 1958; Sehgal 1969; Felker & Goodwin 1988; Faranda et al. 1994).

Atualmente, a cultura de endosperma foi testada para aproximadamente 60 espécies (Tab. 1), com destaque para vários estudos realizados com espécies das famílias Actinidiaceae (*Actinidia* spp.), Passifloraceae (*Passiflora* spp.) e Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) (Kin et al., 1990; Mohamed et al., 1996; Li et al., 2008; Popielarska-Konieczna et al., 2011; Antoniazzi et al., 2018; Mikovski et al., 2021; Machado et al., 2022).

Tabela 1. Descrição das condições do meio de cultura para regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro* de endosperma.

Especies	Endosperm stage	Culture conditions	Responses	References
<i>Asimina triloba</i> (L.) Dunal	Immature	BM	callus formation	Lampton R. K. 1952
<i>Zea mays</i> L.	Mature	White + YE	No calluses	Straus and La Rue 1954
<i>Lolium perenne</i> L.	Immature	BM + YE (0.5%) + IAA (5.7 µM)	callus formation	Norstog 1956
<i>Zea mays</i> L.	Immature	Nitsch's medium + sucrose 2% + Seitz filter-sterilized yeast extract	callus formation	Tamaoki and Ullstrup 1958
<i>Cucumis sativus</i> L.	Immature	BM + IAA (22 mg/l) + diphenylurea (5 mg/l)	callus formation	Nakajima 1962

<i>Santalum album</i> L.	Mature	BM + 2,4-D + KN + YE	callus formation	Rangaswamy and Rao 1963
<i>Zea mays</i> L.	Immature	YE medium + yeast extract 0.5% + agar 0.9%	callus formation: 97.5%	Mamoru and Fusao 1965
<i>Exocarpos cupressiformis</i> Labill.	Mature	White + 2,4-D (9.04 μ M) + KN (23.2 μ M) + CH (2.5g/l)	callus formation	Johri and Bhojwani 1965
<i>Ricinus communis</i> L.	Mature	BM + 2,4-D + KN + YE	callus formation	Satsangi and Mohan 1965
<i>Croton bonplandianus</i> Baill.	Mature	BM + 2,4-D + KN + YE	callus and embryo formation	Bhojwani 1966
<i>Dendrophthoe falcata</i> (L. f.) Ettingsh.	Mature	Callus induction: White + IBA (24.6 μ M)	callus formation	Johri and Nag 1968
<i>Dendrophthoe falcata</i> (L. f.) Ettingsh.		<i>de novo</i> organogenesis: Kinetin (23.2 μ M) or Ad (148 μ M)	<i>de novo</i> organogenesis: 80%	Johri and Nag 1968
<i>Phoradendron tomentosum</i> (DC.) Engelm. ex A. Gray	Mature	BM + 2,4-D + KN + YE	callus formation	Bajaj 1970
<i>Taxillus cuneatus</i> (B. Heyne ex Roth) Danser / <i>T. vestitus</i> (Wall.) Danser	Mature	<i>de novo</i> organogenesis: BM + KN (5 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis 80%	Johri and Nag 1970
<i>Scurrula pulverulenta</i> (Wall.) G. Don	Mature	BM + cytokinin	<i>de novo</i> organogenesis	Bhojwani and Johri 1970
<i>Croton bonplandianus</i> Baill.	Mature	White + 2,4-D (9.04 μ M) + KN (23.2 μ M) + YE (2.5 g/l)	callus formation	Bhojwani and Razdan 1971
<i>Croton bonplandianus</i> Baill.		White + IBA (0.1 μ M)	<i>de novo</i> organogenesis	Bhojwani and Razdan 1971
<i>Ricinus communis</i> L.	Mature	WB + 2,4-D (9.04 μ M) + KN (23.2 μ M) + YE (2.5 g/l)	callus formation: 80%	Srivastava 1971
<i>Nuytsia floribunda</i> (Labill.) R. Br. ex G. Don	Mature	BM + IBA + KN + CH	callus formation	Nag and Johri 1971
<i>Leptomeria acida</i> R. Br.	Mature	BM + IAA + KN	callus and <i>de novo</i> organogenesis	Nag and Johri 1971
<i>Jatropha panduraefolia</i> Andri	Mature	BM + 2,4-D (2.0 ppm) + KN (5.0 ppm) + YE (2500 ppm)	callus formation	
<i>Jatropha panduraefolia</i> Andri	Mature	BM + CH (1000 ppm)	<i>de novo</i> organogenesis	Srivastava 1971
<i>Jatropha panduraefolia</i> Andri	Mature	BM + KN (0.5 ppm) + CH (500 ppm)		

<i>Coffea arabica</i> L.	Immature	MS + ME (500 mg/l) + CH (200 mg/l)	callus formation	Keller et al. 1972
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Mature	Callus induction: White + IAA (5.7 µM) + 117 mM Sucrose + YE (5 g/l)	<i>de novo</i> organogenesis: 85,2%	Smith and Stone 1973
MORPHOGENESIS IN ENDOSPERM CULTURES				Johri 1973
<i>Putranjiva roxburghii</i> Wall.	Mature	BM + IAA (2.0 ppm) + KN (5.0 ppm) + CH (1000 ppm)	callus formation: 72%	Srivastava 1973
<i>Putranjiva roxburghii</i> Wall.	Mature	BM + IAA (2.0 ppm) + KN (5.0 ppm) + CH (1000 ppm)	<i>de novo</i> organogenesis: 85%	
<i>Putranjiva roxburghii</i> Wall.	Mature	BM + IAA (1.2 X 10 ⁻⁵ M)		
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Immature	Callus induction: BM + 4% sucrose + CH (0.25%) + IAA (1ppm)	callus formation: 68%	Sehgal 1974
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Immature	Callus multiplication: BM + CM (10%) + 2,4-D (1ppm)		Sehgal 1974
<i>Triticum aestivum</i> L.	Immature	Callus induction: (a) BM + CM (10%) + IAA (1PPM) or (b) BM + CM (10%) + Kn (0.5ppm)	callus formation: 62%-84%	Sehgal 1974
<i>Codiaeum variegatum</i> Blume	Mature	White + 2,4-D (4.5 µM) + KN (4.65 µM) + CH (0.5 g/l) + CM (10%)	callus formation	Chikkannaiah and Gayatri 1974
<i>Codiaeum variegatum</i> Blume	Mature	White + 2,4-D (4.5 µM) + CH (0.5 g/l) CH + CM (10%)	<i>de novo</i> organogenesis	Chikkannaiah and Gayatri 1974
<i>Oryza sativa</i> L.	Immature	BM + 2,4-D (10-5M) + YE (0.4%)	callus formation	Nakano et al. 1975
<i>Oryza sativa</i> L.	Immature	BM + YE (0.4%)	<i>de novo</i> organogenesis	Nakano et al. 1975
<i>Oryza sativa</i> L.	Immature	BM + YE (0.4%) + IAA (10-5M)		Nakano et al. 1975
<i>Nigella damascena</i> L.	Mature		somatic embryogenesis	Sethi and Narayanaswamy 1976
<i>Malus pumila</i> Mill.	Immature	BM + NAA (0.5 ppm)	callus formation	Mu et al. 1977
<i>Malus pumila</i> Mill.	Immature	MS + BAP + casein hydrolysate	<i>de novo</i> organogenesis	Mu et al. 1977
<i>Vitis</i> sp.	Mature	BM + 2,4-D + CH	callus formation	Mu et al. 1977 (2)
<i>Petroselinutn hortense</i> Hoffm.	Mature	MS + 3% sucrose and 0.6% Difco bactoagar	callus and embryo formation	Masuda et al. 1977

<i>Achras sapota</i> L.	Mature	BM + 2,4-D (2 mg/l) + KN (5 mg/l) + CM (15%) + CH (400 mg/l)	callus formation	Bapat and Narayanaswamy 1977
<i>Citrus grandis</i> Osbeck	Mature	MT + 2,4-D (2ppm) + BA (5ppm) + CH (1,000ppm)	callus formation	Wang and Chang 1978
and <i>Citrus simensis</i> Osbeck	Mature	2MT + GA (2—15 ppm)	somatic embryogenesis	Wang and Chang 1978
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	Mature	MS + BAP (1 mg/l) + CH (500 mg/l)	callus and embryoids formation	Liu and Liu 1980
<i>Santalum album</i> L.	Immature	Callus induction: MS + BAP (0.5–2 mg/l) + NAA (1 mg/l)	-	Lakshmi Sita et al. 1980
<i>Santalum album</i> L.	Immature	Embryo differentiation: MS + GA (1–2 mg/l) or MS + BAP (0.3 mg/l) + IAA (1 mg/l) or MS + GA (1 mg/l) + kinetin (0.3 mg/l)	-	Lakshmi Sita et al. 1980
<i>Santalum album</i> L.	Immature	Shoot and Root development: White + IAA (0.5 mg/l)	-	Lakshmi Sita et al. 1980
<i>Oryza sativa</i> L.	Mature and immature	Callus induction: MS + 2,4-D (2 mg/l)	-	Bajaj et al. 1980
<i>Oryza sativa</i> L.	Mature and immature	Subculture: MS + 2,4-D (1 mg/l)	-	Bajaj et al. 1980
<i>Oryza sativa</i> L.	Mature and immature	Shoot regeneration: MS + IAA (4 mg/l) + kinetin (2 mg/l)	-	Bajaj et al. 1980
<i>Euphorbia geniculata</i> Ortega	Mature	MS + NAA/IAA (0.1 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Sehgal et al. 1981
<i>Actinidia chinensis</i> Planch.	-	Callus induction: MS + Zeatin (3 ppm) + 2,4-D (0.5 ppm) + CH (400 ppm)	callus formation	Gui et al. 1982
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	Mature	MS medium	<i>de novo</i> organogenesis	Cheema and Mehra 1982
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.	Immature	Callus induction: MS + 2,4-D (2 mg/l) + Kinetin (10 mg/l) + Casein hydrolysate (1000 mg/l) + Glutamine (500 mg/l)		Simola and Honkanen 1983
<i>Cocos nucifera</i> L.	Immature	BM + 2,4-D (50 mg/l) + KN (2 mg/l)	callus formation	Kumar et al. 1985
<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Mature	MS + 2% sucrose + 0.8% ágar	<i>de novo</i> organogenesis: 50%	Sehgal and Khurana 1985
<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Mature	Callus induction: IAA (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) or 2,4-D (1 mg/l) + kinetin (1 mg/l)		Sehgal and Khurana 1985

<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Mature	Regeneration: IAA (0.1 mg/l) + BAP (0.2 mg/l)		Sehgal and Khurana 1985
<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Mature	Stretching and rooting- NAA (0.002 mg/l)		Sehgal and Khurana 1985
<i>Lycium chinense</i> Mill.	Mature	BM + NAA (0.1 mg/l) + BAP (0.5 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Gu et al. 1985
<i>Cocos nucifera</i> L.	Immature	BM + 2,4-D (50 mg/l) + KN (2 mg/l)	callus and embryoids formation	Kumar et al. 1985
<i>Annona squamosa</i> Linn	Mature	White + Kinetin (0.1 mg/l) + BAP (0.2 mg/l) + Nitsch (1.0 mg/l), GA 3 (1.0 mg/l)	callus formation	Sreelata Nair et al 1986
<i>Annona squamosa</i> Linn		Nitsch + IAA (5.0 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Sreelata Nair et al 1986
<i>Annona squamosa</i> Linn		Nitsch + NAA(0.5 mg/l) BAP(2.0 mg/l)		Sreelata Nair et al 1986
<i>Asparagus officinalis</i> L.	Immature	MS + NAA (0.5 mg/l) + BAP (1.0 mg/l)	<i>de novo organogenesis</i>	Liu et al. 1987
<i>Juglans regia</i> L.	Mature	BM + IBA (0.01 mg/l) + KN (0.2 mg/l) + BAP (0.1 mg/l) + glutamine	callus and embryoids formation	Walt Tulecke et al 1988
<i>Pyrus communis</i> L.	Immature		<i>de novo</i> organogenesis	Zhao 1988
<i>Coffea</i> sp.	Immature		somatic embryogenesis	Raghuramalu 1989
<i>Actinidia</i> spp.	Mature	Callus induction: LS + Zeatin (13.7 μ M) + NAA (0.54 μ M) + Casein (0.4 g/l)	Embryogenic callus: 7%	Mu Shih Kin et al. 1990
<i>Actinidia</i> spp.	Mature	Buds induction: LS+ Zeatin (4.6 μ M) + CH (0.4 g/l) + 3% sucrose		Mu Shih Kin et al. 1990
<i>Actinidia</i> spp.	Mature	Induction of roots and seedlings: LS+ IBA (490 μ M)	-	Mu Shih Kin et al. 1990
<i>Citrus x paradisi</i>	Immature	Callus induction: MT + BA (22.2 μ M) + Kinetin (9.04 μ M) + (23.2 μ M) ou MT + 2,4-D + 1 g/l CH +0.5 g/l ME.	Callus formation: 52.1%	Gmitter et al. 1990
<i>Citrus x paradisi</i>	Immature	<i>de novo</i> organogenesis: 2 MT + BA (5.5 μ M) + Ad (14.8 μ M) + GA (5.77 μ M) + Casein (0.5 g/l)	-	Gmitter et al. 1990
<i>Citrus reticulata</i> cv. Ponkan		BM + zeatin (2.0 mg/l) + GA (0.5 mg/l) or IAA (0.1 mg/l)		Chen et al 1990
<i>Citrus reticulata</i> cv. Ponkan		BM + GA (0.5 mg/l) + ABA (0.1 mg/l)	somatic embryogenesis	Chen et al 1990
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Mature	MS + BAP (0.1 mg/l) + 2,4-D (1 mg/l) + GA (10 mg/l)	callus induction	Kagan-Zur et al. 1990
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile	Immature	MS + sucrose 3% + 0.8% agar	embryogenic callus: 7%	Garg et al. 1996

		Embryogenic callus induction: 2,4-D (10 µM) + BAP (25 µM) + casein (1000 mg/l)		
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile	Immature	Somatic embryo germination: MSm + B5 major salts, inositol, glutamine, CW, CH, e 0.2% phytigel		Garg et al. 1996
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	MS + 0.09 M sucrose	Regeneration: 85% Growth and development: 100%	Mohamed et al. 1996
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	Regeneration: BA (2 µM)		Mohamed et al. 1996
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	Growth and development: GA ₃ (29 µM) + CH (1000 mg/l)		Mohamed et al. 1996
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	Stretching: MS		Mohamed et al. 1996
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	Rooting: NAA (5 µM)		Mohamed et al. 1996
<i>Acanthopanax sciadophylloides</i> Franch. et Sav.	Mature	MS + 2,4-D (0.5 mg/l)	callus formation: 100%	Toru Taniguchi et al. 1996
<i>Acanthopanax sciadophylloides</i> Franch. et Sav.	Mature	MS + 2,4-D (0.1 mg/l) + BAP (1.0 mg/l)	somatic embryogenesis	Toru Taniguchi et al. 1996
<i>Acanthopanax sciadophylloides</i> Franch. et Sav.	Mature	half-strength MS		Toru Taniguchi et al. 1996
<i>Mallotus philippensis</i> Muell. Arg.	Mature	MS + 2,4-D (2 mg/l) + kinetin (0.5 mg/l)	callus induction	Sehgal and Abbas 1996
<i>Mallotus philippensis</i> Muell. Arg.	Mature	MS + BA (3 mg/l) + casein hydrolysate (1000 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Sehgal and Abbas 1996
<i>Mallotus philippensis</i> Muell. Arg.	Mature	MS + BA (3mg/l) + NAA (0.2 mg/l)		Sehgal and Abbas 1996
<i>Mallotus philippensis</i> Muell. Arg.	Mature	MS + phloroglucinol (2 mg/l) + IBA (1 mg/l)		Sehgal and Abbas 1996
<i>Actinidia spp.</i>	Mature	MS + 2,4-D (2 or 4 mg/l) and kinetin (5 mg/l) after callogenesis transferred to: MS + IAA (0.1 mg/l) and BAP (1 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis: 40%	Machno and Przywara 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Callus induction: MS (½N) + zeatin (10 µM) + IAA (10 µM) + casein (500 mg/L)	callus formation: 24%	Tao et al. 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	MSm (1/2 force for nitrats)	<i>de novo</i> organogenesis: 37%	Tao et al. 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Callus induction: Zeatin (10 µM) + IAA (10 µM) + CH (500 mg/l)		Tao et al. 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Subculture: Zeatin (10 µM) + IAA (1 µM)		Tao et al. 1997

<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Adventitious shoot: Zeatin (10 μ M) + IAA (0.1 μ M)		Tao et al. 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Growth: Zeatin (5 μ M) + IBA (1 μ M)		Tao et al. 1997
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Mature	Rooting: IBA (1.5 mM) $\rightarrow$ 1/2 MS		Tao et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv .	Mature	MS + BAP (1.0 mg/l) + NAA (1.0 mg/l)	callus formation: 40%	Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv .	Mature	MS + ZT (1.0 mg/L) and NAA (1.0 mg/ L)		Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	Mature	MS + BAP (2.0 mg/ l,) and NAA (0.5 mg/ l,)		Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	Mature	MS + BAP (1.2 mg/L) and NAA (0.15 mg/l,)	<i>de novo</i> organogenesis: 5%	Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	Mature	MS medium + BAP (1.25 mg/l) + IBA (0.4 mg/l)		Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	Mature	MS medium		Dengyun Zhu et al. 1997
<i>Morus alba</i> L.	Immature	MS + 3% saccharose + 0.8% ágar	Callus formation: 70–72%	Thomas et al. 2000
<i>Morus alba</i> L.	Immature	Callus induction: BAP (5 μ M) + NAA (1 μ M) + CM (15%) or YE (1000 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis: 62.5–75%	Thomas et al. 2000
<i>Morus alba</i> L.	Immature	Multiplication: 2,4-D (5 μ M)		Thomas et al. 2000
<i>Morus alba</i> L.	Immature	Shoot regeneration: TDZ (1 μ M) or BAP (5 μ M) + NAA (1 μ M)		Thomas et al. 2000
<i>Morus alba</i> L.	Immature	Shoot multiplication: 5 or 7 μ M BAP		Thomas et al. 2000
<i>Morus alba</i> L.	Immature	Rooting: 1/2 MS + IBA (7 μ M)		Thomas et al. 2000
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Mature	MS + 2,4-D (2mg/l) + BA (0.2mg/l)	callus formation	Wu et al. 2002
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Mature	MS + LZT (3mg/l) + NAA (0.2mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Wu et al. 2002
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	MS + 3% sucrose + 0.8% agar	callus formation: 53%	Chaturvedi et al. 2003
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	Callus induction: NAA (5 μ M) + BAP (2 μ M) + CH (500 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis: 95%	Chaturvedi et al. 2003
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	Shoot regeneration: BAP (5 μ M)		Chaturvedi et al. 2003
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	Stretching: BAP (0.5 μ M)		Chaturvedi et al. 2003
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	Multiplication: BAP (1 μ M) + CH (250 mg/l)		Chaturvedi et al. 2003
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Mature	Rooting: 1/2 MS + IBA (0.5 μ M)		Chaturvedi et al. 2003
<i>Iris ensata</i> Thunb.	Mature	MS + 2,4-D (1 mg/l) + kinetin (0.2 mg/l)	callus formation: 70%	Boltenkov et al. 2004

<i>Iris ensata</i> Thunb.	Mature	MS + 2,4-D (1.0 mg/l) + BAP (1.0 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Boltenkov et al. 2004
<i>Iris ensata</i> Thunb.	Mature	MS + NAA (2 mg/l)		Boltenkov et al. 2004
<i>Iris ensata</i> Thunb.	Mature	MS + NAA (2 mg/l) + BAP (0.5 mg/l)	somatic embryogenesis	Boltenkov et al. 2004
<i>Passiflora</i> spp.	Mature	MS + 2,4-D (13.6 µM/l) + kinetin (9.3 µM/l)	callus formation	Guzzo et al. 2004
<i>Passiflora</i> spp.	Mature	MS + kinetin (0.93 µM/l) + NAA (1.0 µM/l)	somatic embryogenesis	Guzzo et al. 2004
<i>Actinidia deliciosa</i> (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson	Mature	Callus induction: MS + 2,4-D (2 mg/l) + kinetin (5 mg/l)	callus formation: 80%	Góralski et al. 2005
<i>Actinidia deliciosa</i> (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson	Mature	Shoot regeneration: MS + TDZ (0.5 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Góralski et al. 2005
<i>Actinidia deliciosa</i> (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson	Mature	Rooting: the shoots were extracted from the callus → soaked in a solution of- IBA (100 mg/l) → 1/2 MS		Góralski et al. 2005
<i>Jatropha curcas</i> L.	Mature	MS + TDZ (0.4 mg/l) + 2,4-D (2.0 mg/l)	callus formation	Hou et al. 2006
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Immature	Callus induction: MS + BAP (4.44 µM) or kinetin (2.32 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 90%.	Walia et al. 2007
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Immature	Shoot induction: MS + 2,4-D (4.5 µM) + TDZ (2.27 µM)	-	Walia et al. 2007
<i>Cycas revoluta</i> Thunb	Mature	MS medium + Picloram (20 µM/l)	callus formation: 100%	Kiong et al. 2008
<i>Eucalyptus</i> sp.	Immature	Callus induction: MS + BA (6.66 µM) + IAA (5.34 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 50%	Li et al. 2008
<i>Eucalyptus</i> sp.	Immature	Shoots induction: MS + BA (4.44 µM) + NAA (5.37 µM)		Li et al. 2008
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	MS + 3% sucrose + 0.2% gellan gum	Callus formation: 63.3%	Miyashita et al. 2009
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	Callus induction: BA (2.22 µM) + IBA (0.49 µM)		Miyashita et al. 2009
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	Shoot regeneration: BA (2.22 µM) + IBA (0.49 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 10%	Miyashita et al. 2009
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	Shoot proliferation: 1/2 MS + GA ₃ (2.89 µM)		Miyashita et al. 2009
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	Stretching and rooting: 1/2 MS + BA (0.44 µM) + GA ₃ (2.89 µM)		Miyashita et al. 2009
<i>Lonicera caerulea</i> L.	Immature	Shoot development: 1/2 MS		Miyashita et al. 2009

<i>Carica papaya</i> L.	Immature	Callus induction: MS + 2,4-D (6.0 µM) + NAA (2.5 µM) + KT (4.0 µM)	callus formation: 67,8%	Sun et al. 2011
<i>Carica papaya</i> L.	Immature	Shoot induction: TDZ (3.0 µM) + NAA (1.5 µM) or BA (1.5 µM) + IAA (3.0 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 93,8%	Sun et al. 2011
<i>Carica papaya</i> L.	Immature	Shoot and root development: 1/2MS + IBA (2.0 µM)		Sun et al. 2011
<i>Euonymus alatus</i> (Thunb.) Siebold	Mature and Immature	Callus induction: MS + BA (2.22 µM) + NAA (2.7 µM)	callus formation: 51%.	Thammina et al. 2011
<i>Euonymus alatus</i> (Thunb.) Siebold	Mature and Immature	Shoots induction: MS + BA (4.4 µM) + IBA (0.5 µM)		Thammina et al. 2011
<i>Euonymus alatus</i> (Thunb.) Siebold	Mature and Immature	Shoot and root development: WPM + IBA (4.9 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 85%	Thammina et al. 2011
<i>Sapium sebiferum</i> (L.) Dum. Cours.	Mature	Callus induction: MS + BA (4.44 µM) + NAA (5.37 µM)	callus formation: 80%	Tian et al. 2012
<i>Sapium sebiferum</i> (L.) Dum. Cours.	Mature	Shoot induction: MS + BA (8.88 µM) + NAA (1.07 µM)	<i>de novo</i> organogenesis 40–66.7%	Tian et al. 2012
<i>Sapium sebiferum</i> (L.) Dum. Cours.	Mature	Induction of roots and seedlings: MS + IBA (9.84 µM) + activated carbon		Tian et al. 2012
<i>Barringtonia racemosa</i> (L.) Spreng.	Immature	MS + 2,4-D (1.5 mg/l) + kinetin (0.5 mg/l)	callus formation: 100%	Dhiya Dalila Zawawi et al. 2013
<i>Phlox drummondii</i> Hook.	Immature	Callus induction: MS + BAP (5 µM) + NAA (10 µM)	callus formation: 53%	Tiku et al. 2014
<i>Phlox drummondii</i> Hook.	Immature	Callus induction: MS + BAP (5 µM) + NAA (10 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 82%.	Tiku et al. 2014
<i>Taxus chinensis</i> (Pilg.) Rehder	Mature	Callus induction: Gamborg medium (B5) + sucrose (30 g/l) + 2,4-D (2,5 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + agar (7 g/l)	callus formation	Li et al. 2016
<i>Musa sapientum</i> L.	Immature	MS + 2,4-D (0.5 ppm) + Kn (0.5 ppm)	callus formation: 85%	Preeti Ranee Paul et al. 2015
<i>Gomortega keule</i> Mol.	Mature	MS + 2,4-D (0.5 mg/l) + 2iP (0.5 mg/l)	callus formation: 50%	Muñoz-Concha D. 2016
<i>Gomortega keule</i> Mol.	Mature	MS + 2,4-D (0.1 mg/l) + 2iP (0.1 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Muñoz-Concha D. 2016
<i>Gomortega keule</i> Mol.	Mature	OM + IBA (20 mg/l)		Muñoz-Concha D. 2016
<i>Gomortega keule</i> Mol.	Mature	OM + AC (2 g/l)		Muñoz-Concha D. 2016
<i>Cycas revoluta</i> Thunb	Mature	MS + SH + 2,4-D (2.10 µM) + Kn (4.5 µM)	callus formation: 80%	Hatice Demiray et al. 2017
<i>Cycas revoluta</i> Thunb	Mature	MS + SH + 2,4-D (2.10 µM) + Kn (4.5 µM)	somatic embryogenesis: 50%	Hatice Demiray et al. 2017

<i>Cycas revoluta</i> Thunb	Mature	MS + SH + 2,4-D (2.10 µM) + Kn (4.5 µM)		Hatice Demiray et al. 2017
<i>Actinidia kolomikta</i> (Maxim. & Rupr.) Maxim.	Mature	Callus induction: MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + 1/2 or kinetin (5 mg/l)	callus formation: 60%	Asakura and Hoshino 2017
<i>Melia azedarach</i> L.	Immature	Callus induction: MS + NAA (2,0 mg/l) + BAP (1,0 mg/l)	callus formation: 55,9%	Van Thang et al. 2018
<i>Melia azedarach</i> L.	Immature	<i>de novo</i> organogenesis induction: MS + BAP (1,5 mg/l) + NAA (0,5 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis: 98%	Van Thang et al. 2018
<i>Melia azedarach</i> L.	Immature		16,7 media of shoot/explant	Van Thang et al. 2018
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Mature	<i>de novo</i> organogenesis induction: MS + vitamins MS + 0,01% mio-inositol + 3% sucrose + 0.8% ágar + TDZ (9 µM)	<i>de novo</i> organogenesis: 32%	Antoniazzi et al. 2018
<i>Pyrus communis</i> L.	Immature	callus induction: MS + NAA (8.05 µM/l) + BA (13.32 µM/l) + Glutamine (250 mg/l)	callus formation: 39-62%	Ameri et al. 2018
<i>Pyrus communis</i> L.	Immature	callus induction: MS + NAA (8.05 µM/l) + BA (13.32 µM/l) + Glutamine (250 mg/l) + PEG (1%)	somatic embryogenesis: 15-37%	Ameri et al. 2018
<i>Pyrus communis</i> L.	Immature	callus induction: MS + NAA (8.05 µM/l) + BA (13.32 µM/l) + Glutamine (250 mg/l) + PEG (1%) + chilling		Ameri et al. 2018
<i>Pyrus communis</i> L.	Immature			Ameri et al. 2018
<i>Passiflora cristalina</i> Vanderpl. & Zappi	Mature	MS + TDZ (2.0 mg/l)	callus formation	Faria et al. 2018
<i>Passiflora cristalina</i> Vanderpl. & Zappi	Mature	MS + BA (2.0 mg/l)	<i>de novo</i> organogenesis	Faria et al. 2018
<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Mature	Callus induction via <i>de novo</i> organogenesis: MS medium supplemented with 1.5, 2.0, and 3.0 mg L ⁻¹ of 6-benzyladenine or <u>TDZ</u>	-	Silva et al. 2020
<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Mature	Callus induction via <i>de novo</i> organogenesis: MS medium supplemented with 1.5, 2.0, and 3.0 mg L ⁻¹ of 6-benzyladenine or TDZ thidiazuron	-	Silva et al. 2020

<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Mature	Callus induction via de novo organogenesis: MS medium supplemented with 1.5, 2.0, and 3.0 mg L ⁻¹ of 6-benzyladenine or TDZ thidiazuron	-	Silva et al. 2020
<i>Citrus nobilis</i> var Madu		MS + GA (1.0 mg/l)	somatic embryogenesis	Kosmiatin et al. 2020
<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.	Mature	MS + macro, microelements and vitamins (Duchefa) + sucrose (3%) + ágar (Duchefa) (0,6%) and PGRs	-	Abdullah et al. 2021
<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.	Mature	MS + macro, microelements and vitamins (Duchefa) + sucrose (3%) + ágar (Duchefa) (0,6%) and PGRs	-	Abdullah et al. 2021
<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.	Mature	Callus induction: TDZ (0.25, 0.5 or 1.0 mg/l) + 2,4-D (2 mg/l) + kinetin (5 mg/l).	-	Abdullah et al. 2021
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	de novo organogenesis induction: MS+ TDZ (1,5 mg/l)		Mikovski et al. 2021
<i>Passiflora foetida</i> L.	Mature	de novo organogenesis induction: MS+ TDZ (2 mg/l)	de novo organogenesis: 68,2%	Mikovski et al. 2021
<i>Vasconcellea pubescens</i> A. DC.	Mature	Callus induction: MS + kinetin (0, 2, 4 mg/l) and 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l)	-	Zuhro et al. 2021
<i>Haemanthus albiflos</i> Jacq.	Immature	Callus induction: MS + picloram (5 mg/l) + BAP (5 mg/l)	-	Nakano et al. 2021
<i>Actinidia chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> A. Chev	Immature	MS + 10% sucrose + glutamine (2 mg/l) + ABA (2.0 mg/l)	somatic embryogenesis	Iwona Chłosta et al. 2021
<i>Stewartia rostrata</i> S.	Immature	MS + 2,4-D (0.1 mg/l)	somatic embryogenesis: 80%	Gladfelter et al. 2020
<i>malacodendron 'Delmarva'</i>	Immature	MS	somatic embryogenesis: 100%	Gladfelter et al. 2020
<i>S. monadelpha</i> S.	Immature	MS + 2,4-D (4.0 mg/l)	somatic embryogenesis: 80%	Gladfelter et al. 2020
<i>pseudocamellia</i> var. <i>koreana</i>	Immature	MS + 2,4-D (4.0 mg/l)	somatic embryogenesis: 75%	Gladfelter et al. 2020
<i>Stewartia</i> spp.	Immature	chilling (4C for 1 month)	de novo organogenesis: 41-65%	Gladfelter et al. 2020
<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Mature	Callus induction: MS + 2,4-D (18.1 µM) + BA (4.5 µM)	Somatic embryogenesis: 8,8 ± 1,3	Machado et al. 2022
<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Mature	MS + BA (9 µM)	de novo organogenesis	Machado et al. 2022
<i>Vasconcellea pubescens</i> A. DC	Mature	MS + 2,4-D (4.0 mg/l) + Kinetin (2.0 mg/l)	callus formation: 0.24%	Zuhro et al 2022

<i>Passiflora edulis Sims</i>	Mature	MS + zeatin (0.5 and 1.0 mg/L ZT), 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (0.5, 1.0, and 2.0 mg/L 2,4-D) or thidiazuron (0.4, 0.5, 1.0, and 1.5 mg/L TDZ)	callus formation and <i>de novo</i> organogenesis	Tang et al. 2024
-----------------------------------	--------	--	--	------------------

MS: Murashige and Skoog culture medium (Murashige and Skoog 1962), BAP: 6-benzylaminopurine, BA: Benzyladenine; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, GA₃: gibberellic acid, IAA: indole-3-acetic acid, IBA: indole-3-butyric acid, NAA: 1-naphthaleneacetic acid, YE: yeast extract. White culture medium (White 1963), Nitsch culture medium (Nitsch, 1969), MT: Murashige and Tucker culture medium (1969), WPM: Woody Plant Medium, LS: Linsmaier and Skoog (1965) culture medium, CH: hydrolyzed casein, ZT: zeatin, KT: kinetin, TDZ: thidiazuron. Table based on Hoshino et al. (2011) and Wang et al. 2016 with updates.

De acordo com os dados coletados neste estudo, o meio de cultura constituído por sais básicos de MS (Murashige e Skoog 1962) é o mais utilizado para cultura de endosperma *in vitro*, sendo utilizado em 63% dos protocolos estabelecidos (Fig. 2).

A regeneração a partir da cultura de endosperma *in vitro* pode ocorrer diretamente via organogênese *de novo* ou via embriogênese somática, e indiretamente via formação de calo (calogênese). A organogênese *de novo* refere-se à indução e formação de meristema apical do caule ou meristema apical da raiz adventícia, decorrente da expressão da pluripotencialidade da célula vegetal. A organogênese *de novo* e a calogênese constituem a principal via de regeneração a partir da cultura de endosperma *in vitro* (Tabela 1), relatada em 63 e 65% dos estudos, respectivamente (Fig. 2).

A rota de organogênese *de novo* é geralmente induzida pela suplementação do meio de cultura com auxinas e citocininas, ou apenas com citocininas (Hoshino et al. 2011, Silva et al. 2020). Dentre as auxinas utilizadas destacam-se o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 1-naftalenoacético (ANA) (Fig. 2). Dentre as citocininas, a maioria dos estudos relatou o uso de 6-benzilaminopurina (BAP), embora cinetina (KT) e tidiazuron (TDZ) também tenham sido utilizados (Fig. 2).

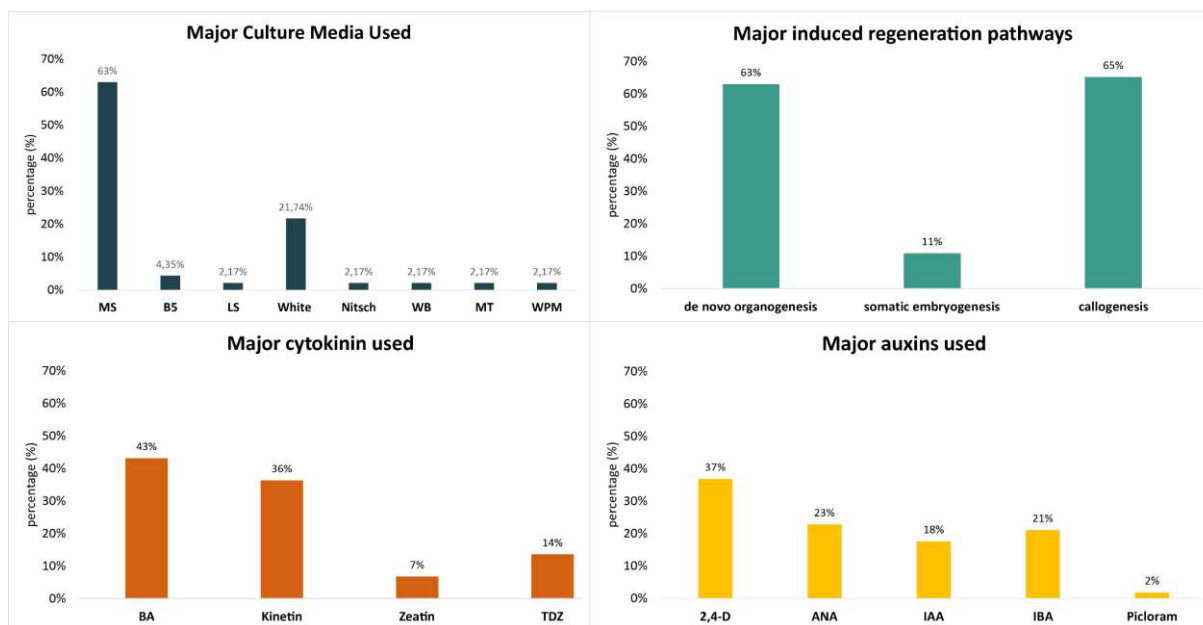


Figura 2: Principais meios de cultura e reguladores de crescimento usados em estudos relacionados à regeneração *in vitro* a partir da cultura de endosperma.

A embriogênese somática é a verdadeira expressão da totipotência vegetal (Fehér, 2019), na qual, sob condições adequadas, as células somáticas se diferenciam em embriões somáticos. Essas estruturas estabelecem seu eixo apical-basal com a especificação de meristemas apicais de caule e meristemas apicais de raiz formados sincronicamente (Rocha & Dornelas, 2013). No entanto, poucos estudos relataram a formação de embriões somáticos a partir da cultura *in vitro* de endosperma (Tabela 1), que inclui *Acacia nilotica* H. Karst., *Petroselinum hortense* Hoffm., *Santalum album* L. e *Passiflora cincinnata* Mast. (Masuda, et al. 1977, Lakishmi et al., 1980, Garg et al., 1996, Machado et al., 2022). Nestes estudos, a cultura do endosperma ocorreu em um meio rico em auxina, principalmente 2,4-D, na ausência de luz (Hoshino et al. 2011).

Neste contexto, observamos que esses processos de regeneração, organogênese *de novo* e embriogênese somática, não são autônomos, mas dependem da sinalização de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura para induzir a reprogramação dos padrões de expressão gênica e a reorganização dos mecanismos de proliferação e diferenciação celular (Fehér 2019). Outro aspecto que também influencia o sucesso da técnica é o estágio de desenvolvimento em que o endosperma

é coletado e cultivado, no qual tanto endospermas maduros quanto imaturos podem ser usados.

3.2 Análise da produção literária

A figura 3 ilustra a evolução das publicações sobre o tema ao longo dos anos, assim como o número de citações registradas em outras fontes. Desde o primeiro artigo publicado na área, em 1933, por Lampe e Mills, que relataram a primeira indução de calos a partir do endosperma de milho, observou-se um crescimento linear de 1,99% por ano na quantidade de publicações relacionadas ao cultivo *in vitro* de endosperma. Os maiores picos de produção científica ocorreram nos anos de 2006 e 2021, somando juntos 18 trabalhos. Já os picos de citações foram registrados nos anos de 2000 e 2009, com pelo menos duas citações por ano. Entre os artigos analisados, apenas 22 foram produzidos por um único autor.

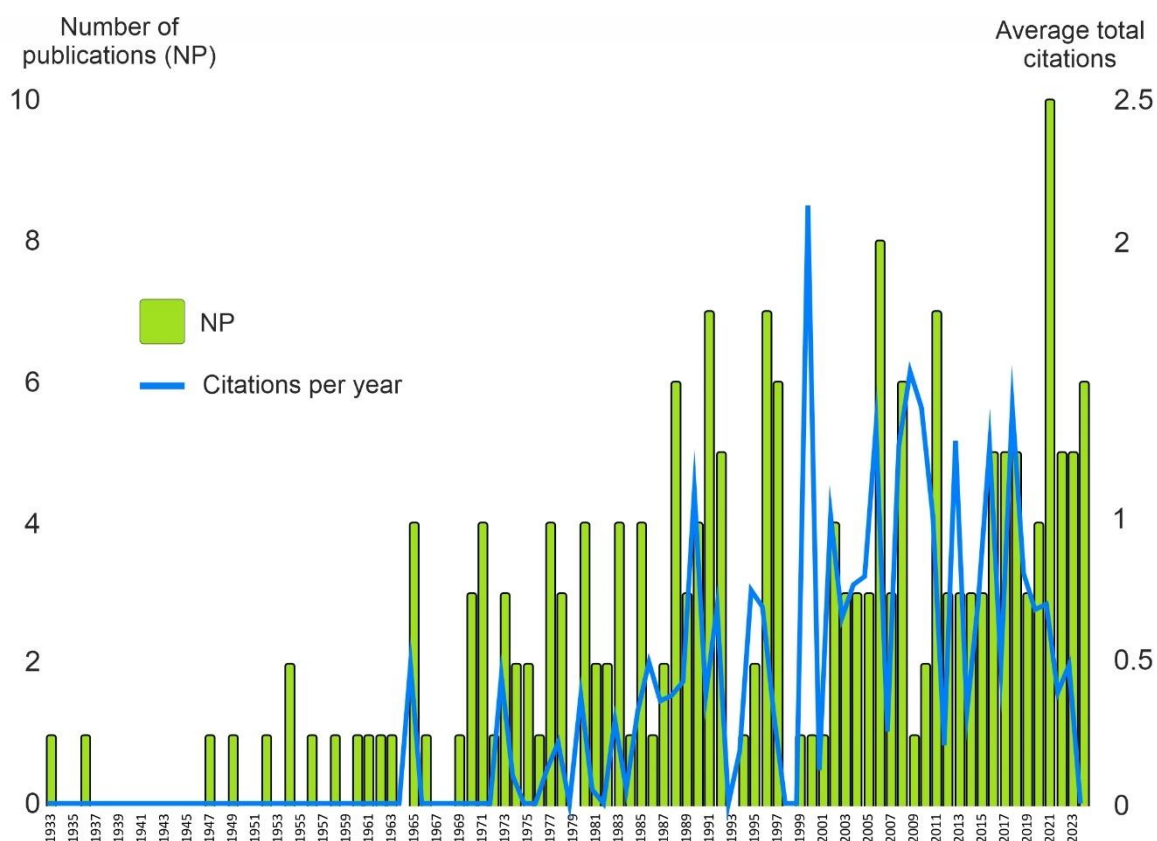


Figura 3: O gráfico apresenta a variação ao longo do ano (eixo x), número de publicações (eixo y) e o número de citações (eixo z). A linha verde indica número de artigos e a linha azul indica o número de citações.

3.3 Países e afiliações com maior produção científica

Foram encontrados trabalhos publicados de 27 diferentes países (Fig. 4). Considerando o número de publicações de acordo com autores de determinado país, a quantidade de vezes em que estes artigos foram utilizados como citação em outros trabalhos, o índice H, que avalia tanto a produtividade quanto o impacto das publicações do país, leva em conta também o número de colaborações internacionais entre os autores em questão, além de computar também a distribuição temática, ou seja, identifica as áreas de maior importância científica de um país, observa as suas tendências e a distribuição de citações por área de conhecimento.

Dentro desta métrica, a China se mostrou mais ativa e obteve 38 pontos, possuindo um total de 19 publicações, sendo apenas 1 delas provinda de colaboração com outros países, também foi citada 156 vezes, com uma média de 8.2 citações por ano desde 1933. Com 37 pontos a Índia apresentou 20 publicações e um total de 310 citações, uma média de 15.5 citações/ano (Fig. 4). A maior atividade da Índia vem da Universidade de Delhi que produziu 19 destes artigos (Fig 4). Em terceiro vem a Polônia com uma pontuação de 35, tendo apresentado sozinha 12 trabalhos e sendo citados 178 vezes, gerando uma média de 14.8 citações/ano. A Universidade Jaquelônica foi responsável por todos os trabalhos apresentados da Polônia. Os Estados Unidos da América, com 24 pontos, produziram 12 trabalhos científicos, sendo que, apenas dois deles foram produzidos em colaboração de outros países, também foram citados 135 vezes, com uma média de 11.2 publicações/ano. Em quinto lugar observa-se o Japão com uma pontuação de 20, tendo ao todo 7 publicações, sendo apenas uma em colaboração. O país foi citado 81 vezes, obtendo uma média de 11,6 publicações/ano. Outra informação relevante é que se juntarmos os 5 países de maior produção científica temos 72 trabalhos, cerca de 35% do total de trabalhos. Se somados os 10 países mais relevantes teremos 106 trabalhos, mais da metade (51.2%) das publicações analisadas nesta bibliometria. A Universidade do Estado de Mato Grosso e a Universidade Federal de Viçosa produziram 7 artigos científicos em parceria. A Universidade de Hokkaido, em Sapporo, obteve 5 publicações científicas, com o mesmo número, a Universidade em Gdansk.

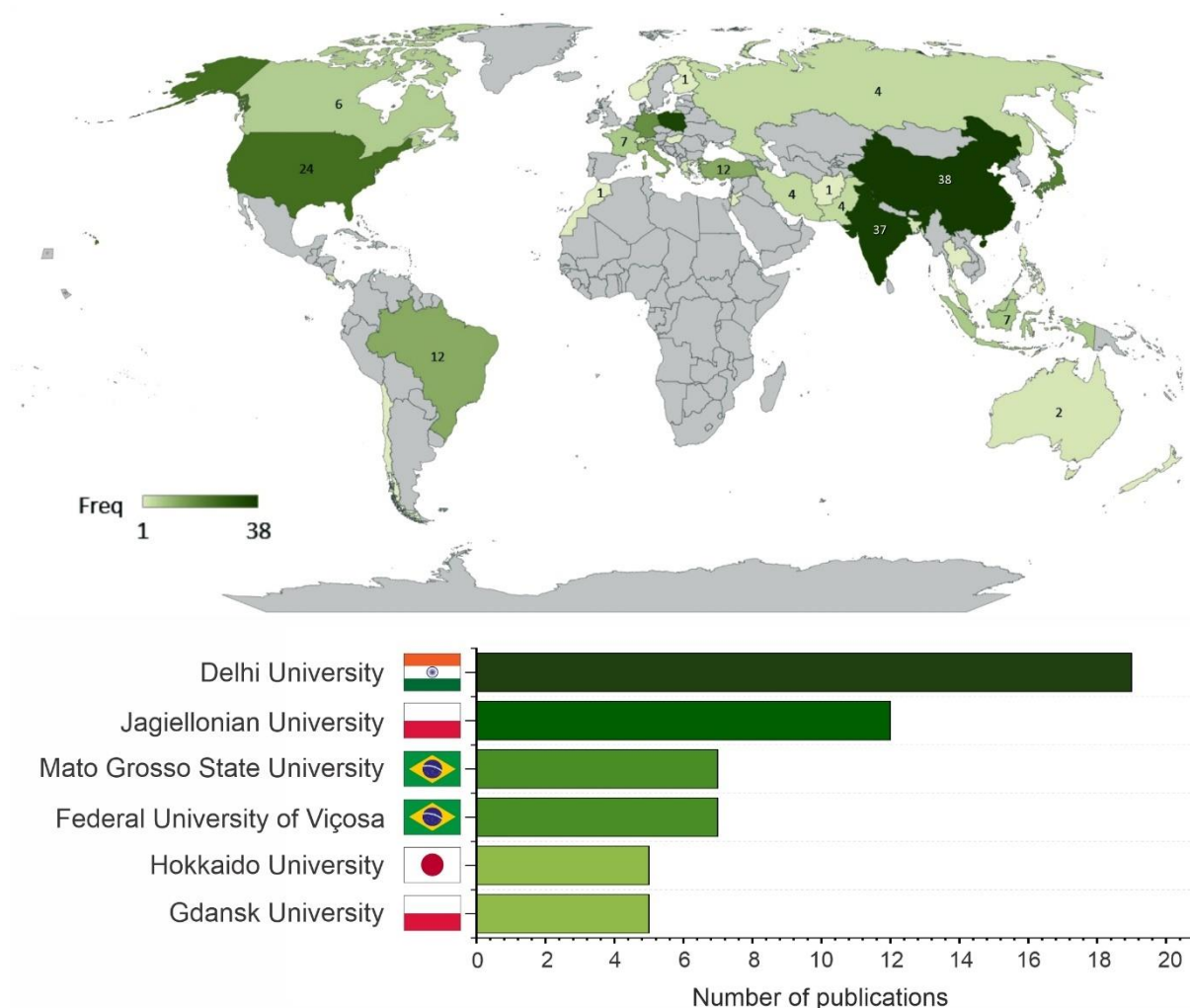


Figura 4: Mapa do mundo indicando pela intensidade da coloração, os países que mais publicaram trabalhos utilizando o endosperma como explante para regeneração de plantas triploides. Gráfico apresenta no eixo y as 6 instituições que mais publicaram na área e seus respectivos países e no eixo x o número de publicações.

3.4 Revistas mais relevantes

Os 207 trabalhos selecionados para análise bibliométrica, foram publicados em 95 diferentes revistas científicas. Após análise, duas destas revistas se destacaram com o maior número de publicações, “Plant Cell Reports” e “Plant Cell Tissue and Organ Culture”. Ambas revistas possuem um total de 15 publicações e juntas representam 14.5% do total de publicações (Tab. 2). Em terceiro lugar está a “Scientia Horticulturae” com 6 artigos, seguida pelas “Physiologia Plantarum” e “Plant Science” com 5 publicações cada.

Tabela 2: Periódicos científicos mais relevantes da área

a- Bibliometrix package.

Nº.	Journal Title	Number of articles	Total Citation ^a	Journal Statistics (2023) ^b				
				H-index	CiteScore (SJr)	IF-2023	Quartiles	Publisher
01	Plant Cell Tissue and Organ Culture	15	213	98	0.58	2.3	Q1	Springer Netherlands
02	Plant Cell Reports	15	359	126	1.32	5.3	Q1	Springer Verlag
03	Scientia Horticulturae	6	106	145	0.83	3.9	Q1	Elsevier B.V.
04	Physiologia Plantarum	5	71	170	1.27	6.4	Q1	Wiley-Blackwell Publishing Ltd
05	Plant Science	5	115	183	1.13	4.2	Q1	Elsevier Ireland Ltd
Subtotal		48	864	Mean	144.4	1.03	4.42	

b- Scimago Journal & Country Rank (SJr; www.scimagojr.com) on 12/08/2024.

3.5 Autores de maior relevância

Foram contabilizados na análise 590 diferentes autores. Na tabela 3 podemos observar os 5 autores de maior relevância para o estudo do cultivo de endosperma, considerando como critério o número de publicações. Em primeiro lugar encontra-se a Dra. Marzena Popielarska-Konieczna, da Universidade Jaqueliniana, na Cracóvia, com um total de 11 publicações, ela vem seguida dos Dr. Wagner Ottoni e Dr. Diego Ismael Rocha, ambos da Universidade Federal de Viçosa e da Dra. Maurecilne Lemes da Silva, da Universidade do Estado de Mato Grosso, todos com um total de 7 artigos publicados. O Dr. Grzegorz Góralski, da Universidade da Jaqueliniana, em quinto lugar, com 6 artigos publicados. Os 10 autores com maior produção científica se somados em relação a quantidade de sua produção na área, são responsáveis por 64 publicações, representando quase 31% do total de publicações relevantes na cultura de endosperma.

Tabela 3: Os 5 autores mais relevantes em termos de publicação relacionada à cultura de endosperma.

Authors	Number of Articles	Authors Statistics*		
		H-index	Total citations	PY-Start
POPIELARSKA-KONIECZNA, Marzena	11	10	210	2008
OTONI, Wagner Campos	7	36	4,414	1994
ROCHA, Diego Ismael	7	16	768	2009
SILVA, Maurecilne Lemes da	7	10	356	2007
GÓRALSKI, Grzegorz	6	13	474	1998

*Author statistic source: SCOPUS on 13/08/2024. PY_start: publication year start.

3.6 Documentos mais citados

Os documentos mais citados indicam os quão influentes tais artigos são na comunidade científica, pois foram lidos e utilizados diversas vezes, também pode indicar uma ótima qualidade da publicação citada ou o seu pioneirismo (Fig. 5). Tendo isto em vista, o documento mais citado foi de Fred Gmitter e mais 2 autores, que fala sobre a indução de triploides em citrus (“Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*”), com um total de 60 citações e uma média de aparição anual de 1.7. Na sequência aparece o artigo “Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *CryIA (b & c)* by expression. in maize endosperm culture” publicado na revista Plant Cell Reports por Ravinder Sardana e mais 6 autores, o mesmo foi citado 56 vezes. Foram relatadas 2008 citações ao todo sendo que, as 10 publicações mais citadas representam 23.9% delas (480 citações) (Fig. 5).

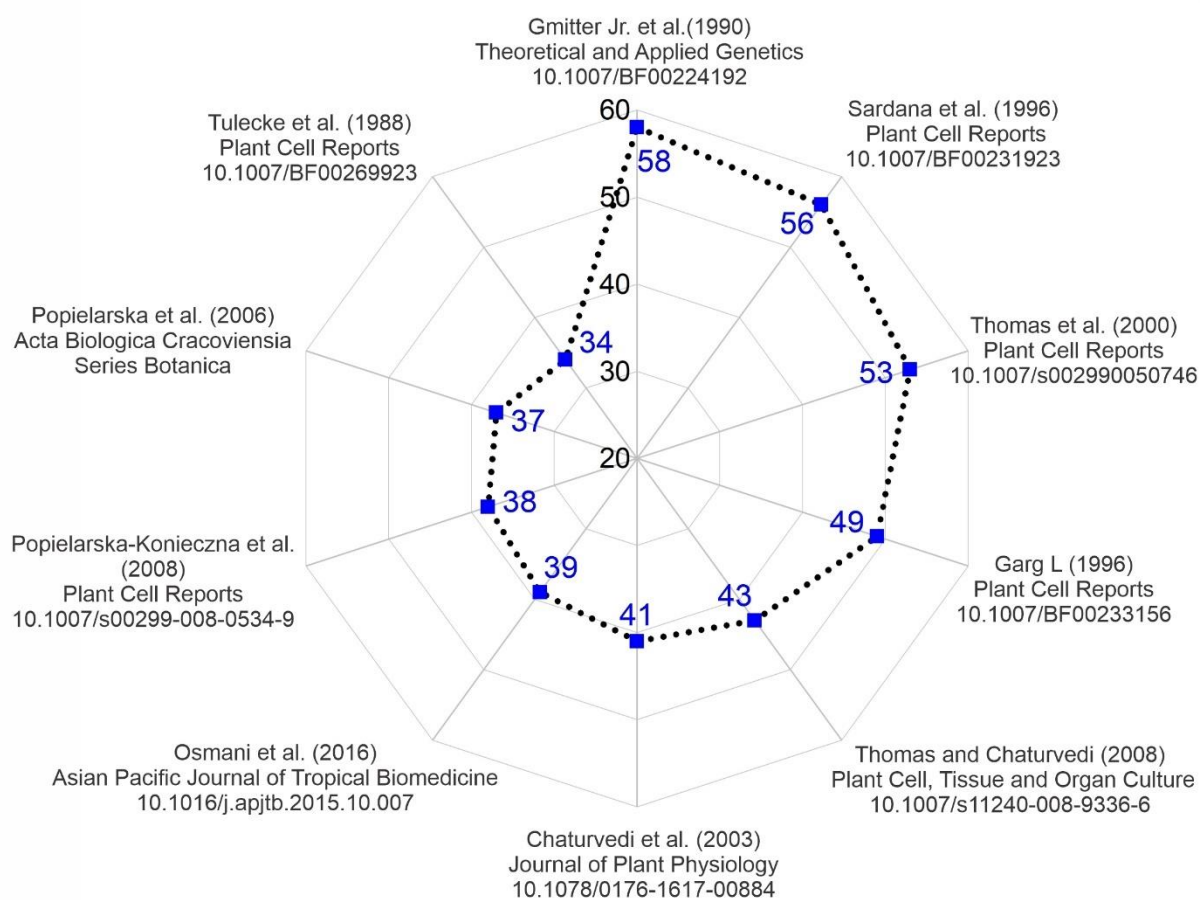


Figura 5: A figura mostra os dez trabalhos com maior número de citações na área de cultivo *in vitro* de endosperma.

3.7 Co-ocorrência de termos e palavras

A palavra de maior ocorrência nos títulos dos trabalhos foi “endosperm” e “culture”, aparecendo 120 e 65 vezes, respectivamente, validando nossa análise. As palavras “regeneration” e “callus” também se fizeram presentes, aparecendo 31 e 30 vezes cada. A palavra “maize” foi observada em 29 títulos, mostrando que o arroz foi uma das principais espécies estudadas desde o início da cultura de endospermas. Outra palavra muito esperada foi “triploid”, representando o principal resultado esperado na regeneração de endospermas, que são plantas triploides, a palavra apareceu 27 vezes (Fig. 6). Estes vocábulos se tornam ainda mais relevantes se comparados as 707 palavras encontradas nas publicações científicas.

Já nas palavras-chave dos autores, foram encontrados 424 termos ao todo. O de maior aparição, novamente já esperado foi “endosperm culture”, com uma ocorrência de 38 instantes. Seguido de “endosperm” e “tissue culture”, sendo vistas 18 e 13 vezes, respectivamente. As palavras “callus”, “callus induction”, “flow cytometry”, “maize” e “plant regeneration” surgiram 10 vezes cada entre as palavras-chave, vale ressaltar que o termo “flow cytometry” se refere a um ensaio muito significativo no cultivo de endosperma, seu resultado nos diz se os calos, órgãos, embriões e plântulas obtidos através da regeneração do endosperma são realmente triploides. Justamente as últimas palavras de maior aparição no nosso top 10, “regeneration” e “triploid”, 9 e 8 vezes, respectivamente.

Novamente com uma grande aparição nos resumos dos artigos estudados, está a palavra “endosperm”, que foi verificada 397 vezes no total de 3679 palavras analisadas. Logo em seguida, aparecendo 249 vezes, a palavra “callus”, sendo um dos produtos mais obtidos na cultura de tecidos. As palavras “medium” e “culture” se fizeram presentes em 207 e 206 ocasiões, respectivamente. “Plants”, “embryos” e “plant” tiveram uma ocorrência de 150, 121 e 114 vezes, sendo resultados também muito significativos na cultura de endospermas. Em oitavo lugar vemos a palavra “MS”, que foi visualizada 104 vezes nas sinopses dos trabalhos, este termo se refere ao meio de cultivo Murashige e Skoog, composto de vitaminas, macro e micronutrientes, além de sais minerais essenciais para o crescimento e manutenção de células e tecidos vegetais *in vitro* de diversas culturas.

A bibliometria também nos fornece a coocorrência das palavras-chaves adicionais (Keywords Plus), que são os termos de maior aparição no título dos artigos citados nas referências dos artigos estudados aqui, gerando uma visão mais ampla

sobre o tema. Foram referenciados 520 termos nesta seção, dentre eles o mais notado foi “somatic embryogenesis”, que apareceu 19 vezes. Em seguida vem a palavra “growth” e “plant-regeneration” que foram visualizadas 16 vezes cada nesses títulos. Em quarto lugar a palavra “endosperm” volta a ser presenciada, com um total de 15 vezes. Já em quinto lugar a palavra “callus”, sendo vista 14 vezes nas citações.

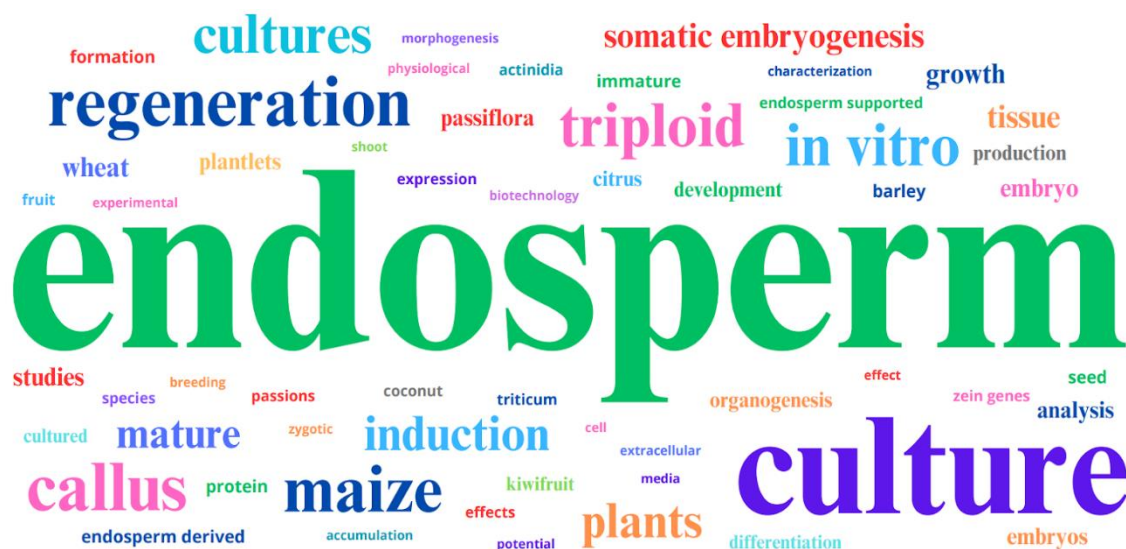


Figura 6: Nuvem de palavras com os termos mais citados nos trabalhos buscados por essa revisão bibliométrica.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos fornecem uma visão abrangente sobre o desenvolvimento e a evolução da literatura relacionada ao cultivo *in vitro* de endosperma e à regeneração de plantas triploides. A análise de 207 artigos publicados em 95 diferentes fontes revela um crescimento contínuo na produção científica, com um aumento linear de 1,99% ao longo dos anos. Esse crescimento pode ser atribuído ao avanço dos métodos de cultivo e à crescente relevância do tema na pesquisa científica. Os picos de publicação observados em 2006 e 2021 indicam períodos de intenso interesse e desenvolvimento no campo, refletindo a evolução das técnicas e a inovação contínua na área (Chandran et al., 2020).

A análise das revistas mais relevantes destaca que "Plant Cell Reports" e "Plant Cell Tissue and Organ Culture" são as principais fontes de publicações, com 15 artigos cada, representando 14,5% do total. A predominância dessas revistas sugere que elas são centros significativos para a disseminação de pesquisas sobre cultivo *in vitro* e

regeneração de plantas (Jahanian et al., 2024; Othmani et al., 2024). A importância dessas revistas pode ser explicada pela sua especialização e pela qualidade das pesquisas que publicam, o que contribui para a alta visibilidade e impacto dos artigos nela publicados.

Entre os autores mais relevantes, Marzena Popielarska-Konieczna e os pesquisadores de outras instituições destacam-se pela sua significativa produção científica. Os dez principais autores são responsáveis por quase 31% das publicações relevantes, indicando que a pesquisa na área é concentrada em um grupo relativamente pequeno de especialistas. Essa concentração pode refletir a especialização e o aprofundamento dos estudos realizados por esses autores, bem como a colaboração contínua entre instituições de pesquisa líderes.

A análise das afiliações e países mostra que a China e a Índia são líderes em termos de número de publicações e citações. A China obteve 38 pontos no índice H e uma média de 8,2 citações por ano, enquanto a Índia, com 37 pontos, teve uma média de 15,5 citações por ano. A alta produtividade da Índia é notável, especialmente devido à contribuição significativa da Universidade de Delhi (Gaurav & Negi, 2021). Esses dados destacam a importância dessas nações no avanço da pesquisa em cultivo de endosperma e regeneração de plantas triploides, refletindo suas capacidades de pesquisa e desenvolvimento robustas.

A análise das citações dos artigos revela sua influência e qualidade na comunidade científica. O trabalho de Fred Gmitter sobre a indução de triploides em citrus é o mais citado, com 60 citações, destacando sua importância no melhoramento genético de frutíferas. Outro artigo relevante, de Ravinder Sardana, sobre a expressão de genes Cry em milho, obteve 56 citações, refletindo sua contribuição para a biotecnologia agrícola. As 10 publicações mais citadas representam 23,9% do total de 2008 citações. A alta taxa de citações desses estudos indica que eles fornecem contribuições fundamentais para o campo, seja por sua qualidade científica ou por seu pioneirismo nas técnicas e abordagens utilizadas.

A análise de co-ocorrências de termos revela que "endosperm" e "culture" são as palavras mais frequentes, refletindo o foco central das pesquisas. A presença recorrente de termos como "regeneration", "callus", e "triploid" destaca os principais temas e objetivos da pesquisa na área. Além disso, a alta ocorrência de termos como "flow cytometry" sublinha a importância dessa técnica na verificação da triploidia e na avaliação da eficiência dos métodos de cultivo *in vitro* (Hawley, 2024). A co-ocorrência

de termos-chave adicionais, como "somatic embryogenesis" e "plant-regeneration", fornece uma visão mais abrangente sobre as tendências e áreas de interesse emergentes na pesquisa.

Em resumo, a análise bibliométrica confirma a importância crescente do cultivo *in vitro* de endosperma e da regeneração de plantas triploides na pesquisa científica. Os resultados destacam a relevância de certas revistas, autores e países, além de evidenciar as principais tendências e focos da pesquisa na área. Neste contexto, a Universidade Federal de Viçosa (UFV) se destaca como um centro relevante de pesquisa, com contribuições significativas dos professores Doutores Wagner Campos Otoni e Diego Ismael Rocha, cujos programas — o Programa de Fisiologia Vegetal e o Programa de Botânica — têm desempenhado papéis fundamentais na evolução e aprofundamento dos estudos nessa área. Esses insights são cruciais para orientar futuros estudos e promover a colaboração entre pesquisadores e instituições ao redor do mundo.

5 REFERÊNCIAS

- Abdullah, M., Sliwinska, E., Góralski, G., Latocha, P., Tuleja, M., Widyna, P., & Popielarska-Konieczna, M. (2021). **Effect of medium composition, genotype and age of explant on the regeneration of hexaploid plants from endosperm culture of tetraploid kiwiberry (*Actinidia arguta*)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(3), 569-582.
- Aria, M., & Cuccurullo, C. (2017), **Bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis**, *Journal of Informetrics*, 11(4), 959-975, Elsevier.
- Asakura, I., Hoshino, Y., (2017). **Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative**. *Scientia Horticulturae*, Volume 219, Pages 53-59, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.045>.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). **Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds**. *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Doll, N. M., Nowack, M. K. (2024). **Endosperm cell death: roles and regulation in angiosperms**, *Journal of Experimental Botany*, *erae052*, <https://doi.org/10.1093/jxb/erae052>.

- Gaurav, K., & Negi, D. S. (2021). **Measuring the research output of university of delhi 2011-2020: a bibliometric study**. *International Journal of Information Library & Society*, 10(2).
- Gora, J. S., Ram, C., Poonia, P. K., Choudhary, M., & Haldhar, S. M. (2022). **Polyploid rootstocks in citrus for mitigation of biotic and abiotic stresses: A review**. *Journal of Agriculture and Ecology*, 13, 1-19.
- Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (Eds.). (2024). **Flow cytometry protocols** (Vol. 2779). Springer Nature.
- Hoshino, Y., Miyashita, T., Thomas, D. T., (2011). **In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding**. *Scientia Horticulturae*, Volume 130, Issue 1, 2011, Pages 1-8, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.041>.
- Hui, T., Bao, L., Shi, X., Zhang, H., Xu, K., Wei, X., & Jiao, F. (2024). **Grafting seedling rootstock strengthens tolerance to drought stress in polyploid mulberry (*Morus alba* L.)**. *Plant Physiology and Biochemistry*, 208, 108441.
- Jahanian, A., Motallebi-Azar, A., Panahandeh, J. et al., (2024). **Evidence of the change in ploidy levels in the plantlets established from endosperm culture of Persian shallot (*Allium hirtifolium*)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 156, 78. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-024-02694-9>.
- Jahanian, A., Motallebi-Azar, A., Panahandeh, J., & Dadpour, M. (2024). **Evidence of the change in ploidy levels in the plantlets established from endosperm culture of Persian shallot (*Allium hirtifolium*)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 156(3), 78.
- Machado, M.D., Souza, C.S., Machado, M. et al., **Novel avenues for passion fruit *in vitro* regeneration from endosperm culture, and morpho-agronomic and physiological traits of triploid *Passiflora cincinnata* Mast. emblings**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 150, 637–650 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02318-0>
- Mikovski, A. I., da Silva, N. T., Silva, L. A. S., Machado, M., de Souza Barbosa, L. C., Reis, A. C., ... & da Silva, M. L. (2021). **From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(2), 239-253.

- Othmani, A., Hamza, H., Kadri, K., Sellemi, A., Leus, L., & Werbrouck, S. P. (2024). **The Promising Potential of Triploidy in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Breeding.** *Plants*, 13(6), 815.
- Razdan Tikku, A., Razdan, M. K., & Raina, S. N. (2014). **Production of triploid plants from endosperm cultures of *Phlox drummondii*.** *Biologia Plantarum*, 58, 153-158.
- R Core Team (2024). **R: A Language and Environment for Statistical. Computing_.** *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- Sun, D. Q., Lu, X. H., Liang, G. L., Guo, Q. G., Mo, Y. W., & Xie, J. H. (2011). **Production of triploid plants of papaya by endosperm culture.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 23-29.
- Thomas, T. D., & Chaturvedi, R. (2008). **Endosperm culture: a novel method for triploid plant production.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 1-14.
- Tian, L., Ke, Y., Gan, S. et al., (2012). **Triploid plant regeneration from mature endosperms of *Sapium sebiferum*.** *Plant Growth Regulation*, 68, 319–324 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9720-4>
- Van Thang, B., Van Viet, N., Nam, V.Q., et al., (2018). **Triploid plant regeneration from immature endosperms of *Melia azedazach*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133, 351–357 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1387-8>

CAPÍTULO II

PERFIL HORMONAL E DINÂMICA DO STATUS OXIDATIVO DURANTE CULTIVO *in vitro* DE ENDOSPERMAS DE MARACUJAZEIROS COM RESPOSTAS MORFOGÊNICAS DIVERGENTES

1 INTRODUÇÃO

A utilização do endosperma como explante para a regeneração *in vitro* apresenta uma rota promissora para a obtenção de plantas, devido à sua natureza triploide originária da fusão de núcleos durante a fecundação (Doll e Nowack 2024, Jahanian et al., 2024, Tang et al., 2024). No gênero *Passiflora*, sistemas de regeneração *in vitro* a partir do cultivo de endosperma foram estabelecidos para espécies como *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora cincinnata* Mast (Antoniazzi et al., 2018, Silva et al., 2020). No entanto, as espécies não respondem de forma igualitária a estas técnicas. *Passiflora edulis*, resposta temporal divergente ao cultivo *in vitro*, comparado a *Passiflora cincinnata*, que demonstra uma alta responsividade a esses processos (Dias et al., 2009; da Silva et al., 2011).

Durante o cultivo *in vitro* os explantes são expostos a condições adversas que geram estresse abiótico. Esse estresse leva à produção de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem gerar danos oxidativos a proteínas, DNA, membrana lipídica entre outras estruturas celulares (Padhair et al., 2006). Para se protegerem contra esses danos oxidativos, as plantas desenvolveram uma gama complexa de sistemas antioxidantes. O sistema antioxidante nas plantas é composto por diversas enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), além de moléculas de baixo peso molecular, como ascorbato (AA), glutationa (GSH) e α -tocoferol, que desempenham o papel de neutralizar radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (Padhair et al., 2006; Gupta, 2010). O equilíbrio delicado entre a geração de ROS e a ação neutralizante dos antioxidantes pode ser comprometido quando os explantes são submetidos às condições de estresse geradas pelo cultivo *in vitro*. O funcionamento correto desses mecanismos são cruciais para a sobrevivência dos explantes e podem influenciar a trajetória da morfogênese.

As espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo celular. As EROs são produzidas durante muitos processos fisiológicos ao longo do ciclo de vida das plantas (Wang et al., 2023). A natureza reativa das ERO torna-as potencialmente maléficas a todos os componentes celulares quando suas concentrações aumentam incontrolavelmente sob estresse. Por outro lado, as ERO funcionam como moléculas sinalizadoras, regulando o crescimento, desenvolvimento e adaptação às condições de estresse (Hasanuzzaman et al., 2020b).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) desempenha papéis importantes na sinalização celular e na defesa contra patógenos. O $O_2^{\cdot-}$ é produzido principalmente através da redução univalente do oxigênio molecular (O_2). NADPH oxidase (NOX), enzima localizada na membrana plasmática, é uma fonte chave de $O_2^{\cdot-}$. Ela transfere elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido no lado externo da membrana plasmática. Outra via de produção envolve a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, onde o $O_2^{\cdot-}$ é gerado como subproduto da respiração celular. Para evitar danos celulares, o $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Esta conversão é crucial para controlar os níveis de $O_2^{\cdot-}$ e prevenir estresse oxidativo (Karpinska e Foyer 2024).

O peróxido de hidrogênio é um subproduto do metabolismo aeróbico e é visto como a forma mais estável de ERO, pois possui tempo de vida relativamente longo. (Nill et al., 2023). O H_2O_2 é formado principalmente pela dismutação do radical superóxido, mediada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Além disso, ele pode ser gerado tanto direta quanto indiretamente por várias enzimas e bem como por processos não enzimáticos (Niu e Liao 2016). Em concentrações moderadas, H_2O_2 pode induzir mecanismos de defesa e adaptação celular, enquanto em altas concentrações pode levar à morte celular programada. Como molécula sinalizadora universal, ele pode difundir-se através das membranas para diferentes compartimentos celulares, participando de numerosos processos fisiológicos e metabólicos nas plantas (Roussos et al., 2023). A degradação do H_2O_2 é essencial para manter o equilíbrio redox celular e evitar danos oxidativos. Enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) desempenham papéis chave nesse processo. A catalase converte H_2O_2 em água e oxigênio, enquanto a APX utiliza ascorbato como doador de elétrons para reduzir o H_2O_2 a água (Hasanuzzaman et al., 2020).

Tanto o $O_2^{\cdot-}$ quanto o H_2O_2 são cruciais para a regulação do estado redox celular e sinalização de respostas ao estresse. Sua produção e degradação equilibrada são essenciais para a manutenção da homeostase celular. O desequilíbrio na produção de EROs pode levar ao estresse oxidativo, associado a várias patologias e danos celulares, enquanto o controle adequado permite que as células respondam eficazmente a estresses abióticos e bióticos (Mololepsza 2005).

A principal fonte de malondialdeído (MDA) nas células é a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Rio et al., 2005). Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) frequentemente sofrem fragmentação por meio de enzimas ou processos não enzimáticos, resultando em uma variedade de produtos de oxidação de cadeia curta. A química desses produtos é complexa e inclui aldeídos, alcanos e alcenos (Sousa et al., 2017). Entre eles, as espécies reativas de carbonila (RCS) como malondialdeído (Alché 2019). O MDA é um marcador importante de estresse oxidativo, surge como subproduto quando os radicais livres atacam as membranas celulares ricas em lipídios, esse processo causa danos significativos às membranas celulares devido à ação dos radicais livres (Farmer & Muller, 2013). Níveis elevados de MDA nas células são indicativos de dano celular e estresse oxidativo (Alché 2019).

Durante a evolução, as plantas utilizaram ERO como moléculas sinalizadoras para regular o crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses ambientais bióticos e abióticos (Sun et al., 2019). As ERO se interrelacionam com as vias de sinalização hormonal, ajustando de maneira coordenada o crescimento vegetal e a resposta ao estresse. Hormônios vegetais são moléculas de pequeno tamanho que desempenham funções vitais em concentrações extremamente baixas nos tecidos (Sun et al., 2019).

Embora auxinas e citocininas sejam amplamente reconhecidas e utilizadas em cultura de tecidos, outros hormônios como etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico, metil jasmonato e brassinoesteroides também desempenham papéis essenciais na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Mathew et al., 2024). O etileno, por exemplo, é um hormônio gasoso que influencia processos como resposta ao estresse (Joo & Kim 2007). O ácido jasmônico e seu derivado metil jasmonato estão envolvidos em respostas de defesa, cicatrização de feridas e também na regulação do crescimento (Tsuzuki et al., 2023). O ácido salicílico é crucial na resposta a patógenos e na ativação de mecanismos de defesa sistêmica adquirida (Liu et al., 2015). Os brassinoesteroides, por outro lado, são hormônios esteroides que

promovem o alongamento celular e estão envolvidos em diversas outras funções, como a regulação do desenvolvimento radicular e da resistência ao estresse. Esses hormônios interagem entre si de maneira complexa, modulando diferentes vias de sinalização que, em conjunto, determinam o desenvolvimento e a adaptação das plantas ao ambiente (Li et al., 2020).

Estudos moleculares têm demonstrado que a manipulação dos níveis endógenos desses hormônios, seja por meio da aplicação ou da engenharia genética, pode resultar em alterações significativas nos processos de desenvolvimento e regeneração *in vitro* (Sharde et al., 2023; Khrize et al., 2024; Tafazoli et al., 2013; Dhabhai & Batha, 2010). No entanto, a compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes à ação desses hormônios em cultura de tecidos ainda requer mais investigação, especialmente em relação à sua interação e influência recíproca nos processos de organogênese e regeneração celular.

Diante deste cenário, o presente estudo visa investigar a dinâmica do status oxidativo e o perfil hormonal durante a regeneração de gemas adventícias a partir do endosperma de *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata*. Estas duas espécies, filogeneticamente próximas, apresentam respostas morfogênicas divergentes ao cultivo *in vitro*, proporcionando um modelo ideal para compreender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos subjacentes à regeneração de plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Sementes maduras de *Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims (população FB-200 Maguary) foram fornecidas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e pelo Viveiro Flora Brasil Ltda., Araguari, MG, respectivamente.

2.2 Organogênese *de novo* a partir do cultivo de endosperma

Para a indução de organogênese *de novo* a partir de endospermas de *P. cincinnata* e *P. edulis* foram utilizados, respectivamente, os sistemas de regeneração propostos por Silva et al., (2020) e Antoniazzi et al., (2018) com modificações. Previamente à desinfestação, sementes de ambas as espécies tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas, em capela de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% (v/v) por 1 min, seguido por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com 3 gotas de

Tween-20 a 0,1% (v/v) durante 15 minutos. Após esse período, foram realizados cinco enxáguos com água deionizada e autoclavada. As sementes permaneceram imersas por duas horas em água, facilitando a extração dos endospermas. Os endospermas foram seccionados longitudinalmente para a remoção dos embriões zigóticos e inoculados em meio de indução, constituído dos sais básicos MS (Murashige & Skoog 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, e 0,28% (p/v) de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de Tidiazuron (TDZ) para a indução de gemas adventícias em endospermas de *P. edulis* e 2,0 mg.L⁻¹ de benziladenina (BA) para *P. cincinnata*. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e autoclavado a 1,1 Pa, 121 °C por 20 min.

Os endospermas foram colocados em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo alíquotas de 12-15 mL de meio de cultura, vedadas com plástico filme PVC. Foram inoculadas 50 placas por experimento, em um total de 3 repetições. As culturas foram mantidas em estufa incubadora (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA) a 27 ± 2 °C por até 30 dias.

2.3 Coleta do Material

Para todas as análises descritas abaixo foram coletadas amostras de endospermas usados como explante inicial e após 5, 10, 15 e 30 dias em meio de indução de organogênese *de novo*. Essas amostras foram adequadamente armazenadas conforme as necessidades das avaliações descritas abaixo.

2.4 Imagens de Lupa

Para documentar as alterações morfológicas nos explantes durante o processo organogênico, as amostras foram fotografadas utilizando microscópio estereoscópico (M165 C, Leica, Alemanha).

2.5 Microscopia de luz

As amostras fixadas em solução FAA 50%, composta por formalina, ácido acético e etanol na proporção de 1:1:18 em volume, por cerca de 48 horas. Em seguida, foram preservadas em etanol a 70% para análise estrutural. Para preparação das amostras, elas foram desidratadas gradualmente em uma série crescente de concentrações de etanol e posteriormente, foram infiltradas e incluídas em resina de

metacrilato (Historesin Leica, Leica Microsystems, Heidelberger, Alemanha). Seções longitudinais com espessura de 6 μm foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo (1508R; Logen Scientific) e lâminas de aço descartáveis de baixo perfil (Leica 819, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, EUA). As seções em lâminas de vidro foram coradas com azul de toluidina (pH 4,6) (O'Brien et al., 1964) e fixadas em resina sintética (Permout; Fisher Scientific, NJ, EUA) para posterior análise.

2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras coletadas foram imersas em solução de FAA 50% para fixação. Em seguida, passaram por desidratação em séries etílica crescentes e foram secas até o ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). Posteriormente, foram montadas em suportes de alumínio utilizando fita de carbono condutora de eletricidade e revestidas com uma camada de ouro por metalização (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). A análise e documentação das amostras foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP, Cambridge, Inglaterra).

2.7 Determinação do teor de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA)

Para determinar o conteúdo de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), foram utilizados 150 mg de endospermas frescos. Esses endospermas foram macerados e adicionados a uma mistura de reação composta por tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,8), NADH 20 μM , $\text{Na}_2\text{—EDTA}$ 0,1 mM e epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N (Mohammadi e Karr 2001). Após incubação a 28 °C por 5 minutos, os endospermas macerados tiveram sua absorbância medida a 480 nm utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific Evolution 60S, Waltham, MA, EUA). O teor de radicais de ânion superóxido foi calculado utilizando um coeficiente de extinção molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

Para determinar o teor de H_2O_2 de acordo com Gay e Gebicki (2000), os endospermas frescos (200 mg) foram homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de hidroxilamina. Após centrifugação a 10.000 g a 4 °C por 15 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a uma mistura de reação contendo 250 μM de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ em 25 mM de H_2SO_4 , 100 mM de sorbitol e 250 μM de xilenol laranja. A absorbância foi medida a 560 nm após incubação no escuro por 30 minutos em um leitor de microplaca (Tecan, Infinite M200

PRO, Männedorf, Suíça). O teor de peróxido de hidrogênio foi determinado utilizando uma curva de calibração construída com padrões autênticos de H₂O₂.

A peroxidação lipídica foi estimada pelo teor de malondialdeído (MDA) produzido após reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Heath e Packer 1968). Para isso, os endospermas frescos (100 mg) foram homogeneizados em 2 mL de TCA 1% (p/v) e centrifugados a 12.000 *g* a 4 °C por 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a uma mistura de reação contendo 0,5% TBA (p/v) em 20% TCA (p/v), incubada a 95 °C por 30 minutos e a absorbância foi medida em dois comprimentos de onda (535 nm e 600 nm). O valor do complexo de conteúdo MDA-TBA foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de $155 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8 Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes

Para a extração das enzimas antioxidantes, endospermas (150 mg) foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8) contendo 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF dissolvido em etanol pa e 1% PVPP (Ribeiro et al., 2012). O sobrenadante foi coletado após centrifugação dos homogenatos a 12.000 *g* por 20 minutos a 4 °C. A atividade da superóxido dismutase foi avaliada adicionando o extrato enzimático a uma solução que continha tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de metionina, 75 µM de NBT e 2 µM de riboflavina (Giannopolitis e Ries 1977). Esta reação foi conduzida a 25 °C sob a luz de um LED (cerca de 1000 lumens). Após 3 minutos de exposição à luz, a reação foi interrompida e a quantidade de formazano azul, produzido pela fotorredução do NBT, foi medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi expressa como a quantidade de enzima imprescindível para inibir a fotorredução do NBT em 50%. Os extratos enzimáticos brutos das outras enzimas foram adicionados a suas respectivas misturas reacionais e, em seguida, a atividade enzimática foi determinada por meio de coeficientes de extinção molar após a leitura das absorbâncias, utilizando os seguintes parâmetros: para a peroxidase total (POX), foi utilizado tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), 20 mM de pirogalol e 20 mM de H₂O₂ (Kar & Mishra, 1976) (a absorbância foi lida a 420 nm, com $\epsilon = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); para a catalase (CAT), foi utilizado tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e 12,5 mM de H₂O₂ (Havir & Mchale, 1987) (a absorbância foi lida a 240 nm, com $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); e para a ascorbato peroxidase (APX), foi utilizado tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0),

0,1 mM de EDTA, 0,8 mM de AsA e 1 mM de H₂O₂ (Nakano e Asada 1981) (a absorvância foi lida a 290 nm, com $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A concentração total de proteínas solúveis nos extratos brutos de enzimas foi determinada utilizando o método de Bradford (1976), com BSA como padrão.

2.9 Determinação do perfil hormonal

Os fitohormônios foram extraídos das amostras de endospermas usados como explantes e ao longo do processo embriogênico. Cerca de 100 mg de tecido fresco foram macerados em nitrogênio líquido, seguido da adição de 400 μL da solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1). As amostras foram agitadas em vórtex (4 vezes por 20 s), sonicadas (5 min) e mantidas no gelo (30 min). Após centrifugação (13000 g , 10 min à 15°C), 350 μL do sobrenadante foram coletados e transferidos para novo tubo. Ao *pellet* resultante, repetiu-se o processo de extração e, em seguida, juntou-se os sobrenadantes. Uma última centrifugação (20000 g , 5 min a 4 °C) foi realizada para remoção de restos de tecido em suspensão.

O extrato obtido foi injetado automaticamente (5 μL) no sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massa tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 2.1 x 50 mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8 μm (Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5, sob fluxo de 0.3 ml min⁻¹ e temperatura da coluna de 23 °C.

No espectrômetro de massa foi utilizada a fonte de ionização ESI (*Electrospray Ionisation*). O equipamento foi operado no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) no qual foi monitorado as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas mediante testes de fragmentação de cada molécula: AIA (176/130), ABA (263/153), etileno via ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) (102,1/56,2), zeatina e o metil jasmonato. AIA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto ABA no modo negativo. Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) utilizando os respectivos padrões de cada hormônio foi feita para a obtenção da quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no *software* "Skyline" para obtenção da área dos picos de

cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng/g de massa fresca de tecido.

2.10 Análise dos dados

Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram analisadas, a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott, quando a regressão não foi significativa. As análises estatísticas foram realizadas no software (R Core Team, 2024). Os testes de Bartlett foram utilizados para determinar a homogeneidade de variâncias. Estas análises foram calculadas no software R

3. RESULTADOS

3.1 Regeneração via organogênese *de novo* e aspectos anatômicos

A figura 1 mostra o processo morfogênico a partir do endosperma em *P. cincinnata* e *P. edulis*. O endosperma de *Passiflora cincinnata* demonstrou maior responsividade em comparação com *Passiflora edulis* após 30 dias de cultivo *in vitro* (Fig 1). O explante inicial é caracterizado por uma coloração branco opaco em ambas as espécies (Fig. 1a,b). Aos 5 dias de cultivo, os endospermas de *P. cincinnata* apresentaram sinais de diferenciação celular e coloração amarelada, sendo reconhecida como fase de aquisição de competência morfogênica (Fig. 1c). Aos 15 dias o explante de *P. cincinnata* apresentou intensa coloração esverdeada e presença de gemas adventícias (Fig. 1e). Aos 30 dias, gemas adventícias completamente diferenciadas, apresentando primórdios foliares e intensa coloração esverdeada foram observadas em *P. cincinnata* (Fig. 1g). Enquanto isso, os endospermas de *P. edulis* intensificaram a coloração esbranquiçada aos 5 dias de cultivo (Fig 1d). Aos 15 dias, o explante de *P. edulis* apresentou coloração esverdeada branda, indicando atividade morfogênica e síntese de clorofila. Já nos 30 dias de cultivo, houve formação de estruturas organogênicas esverdeadas e com mudanças menos pronunciadas em comparação a *P. cincinnata* (Fig. 1i, j). Diante da observação dos resultados de *P. cincinnata* foram estabelecidas as seguintes fases para classificar o processo de organogênese: Explante inicial (0 dias), fase de aquisição de competência (5 dias), fase de determinação (15 dias) e fase de diferenciação (30 dias).

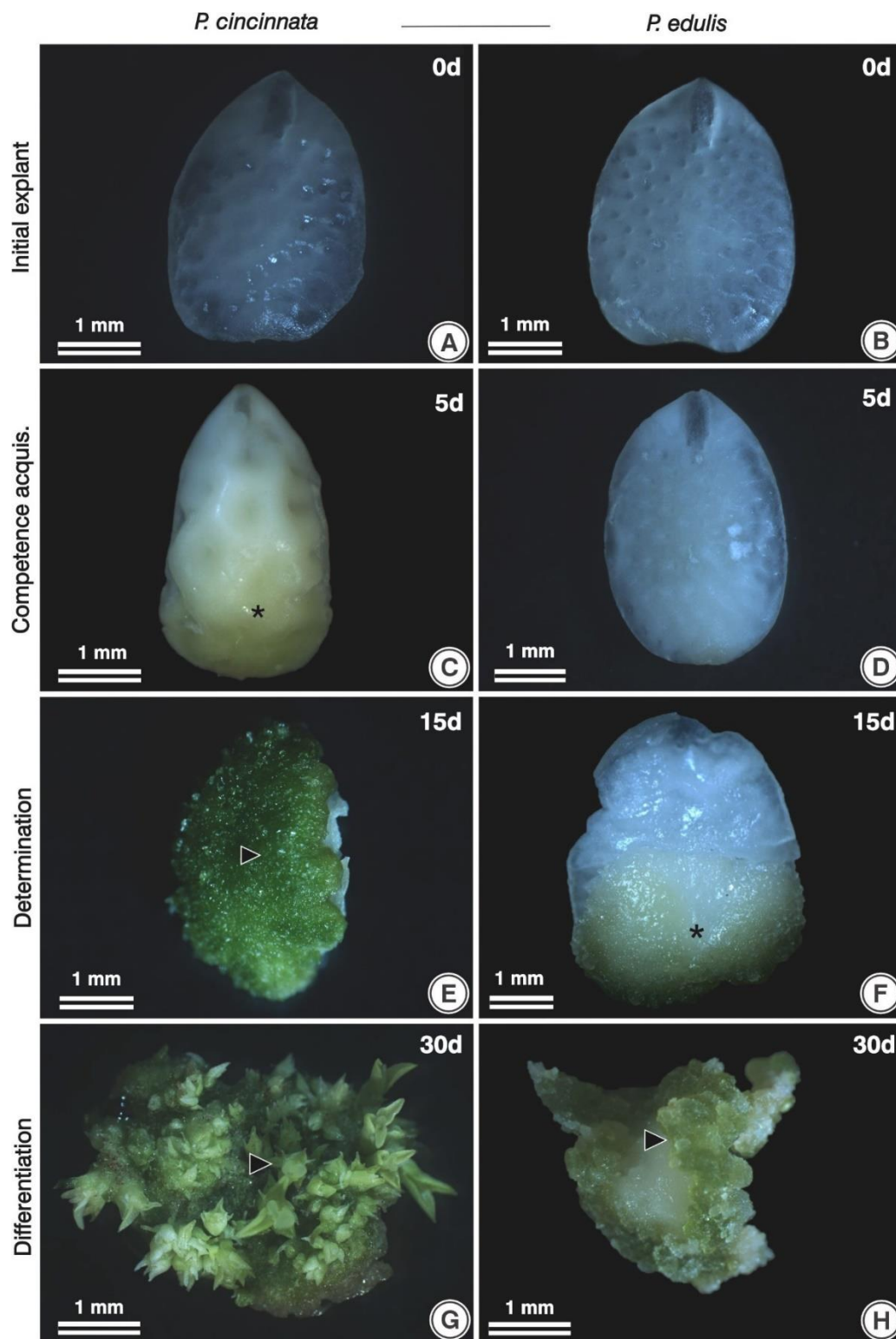


Figura 1 - Comparação das respostas morfogênicas do tecido endospermico de *P. cincinnata* (a, c, e, g) e *P. edulis* (b, d, f, h) submetidos a organogênese *de novo* (DNSO) durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Explante inicial (a, b). Explante na fase de aquisição de competência apresentando coloração amarelada (*) indicando atividade morfogênica (c, d). Explante na fase de determinação de competência com coloração esverdeada, indicando a presença de clorofila e formação de calos organogênicos (cabeça de seta) (e, f). Explante na fase de diferenciação apresentando estruturas calogênicas via organogênese *de novo* (g, h). Barras: a-h = 1 mm.

3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Ao longo do cultivo *in vitro*, o explante inicial exibiu semelhanças em ambas as espécies, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis* (Fig. 2a, b). Durante a fase de aquisição de competência, aos 5 dias, *P. cincinnata* demonstrou um avanço no processo de descamação celular e uma maior atividade celular em comparação com *P. edulis* (Fig. 2c, d). No estágio de determinação, aos 10 dias, *P. cincinnata* apresentava uma intensa proliferação celular, com a formação de estruturas precursoras de tecidos diferenciados, como os meristemóides (Fig. 2e), enquanto *P. edulis* ainda estava no estágio inicial desse processo (Fig. 2f). Com 15 dias, *P. cincinnata* exibiu meristemóides completamente formados (Fig. 2g), enquanto *P. edulis* ainda apresentava evidências de descamação celular, mas sem sinais claros de diferenciação (Fig. 2h). Na fase de diferenciação, aos 30 dias, *P. cincinnata* exibiu gemas adventícias completamente diferenciadas (Fig. 2i), enquanto em *P. edulis* as mudanças morfológicas foram menos pronunciadas (Fig. 2j). Essas observações ressaltam as diferenças na responsividade e no potencial de desenvolvimento entre as duas espécies durante o cultivo *in vitro*.

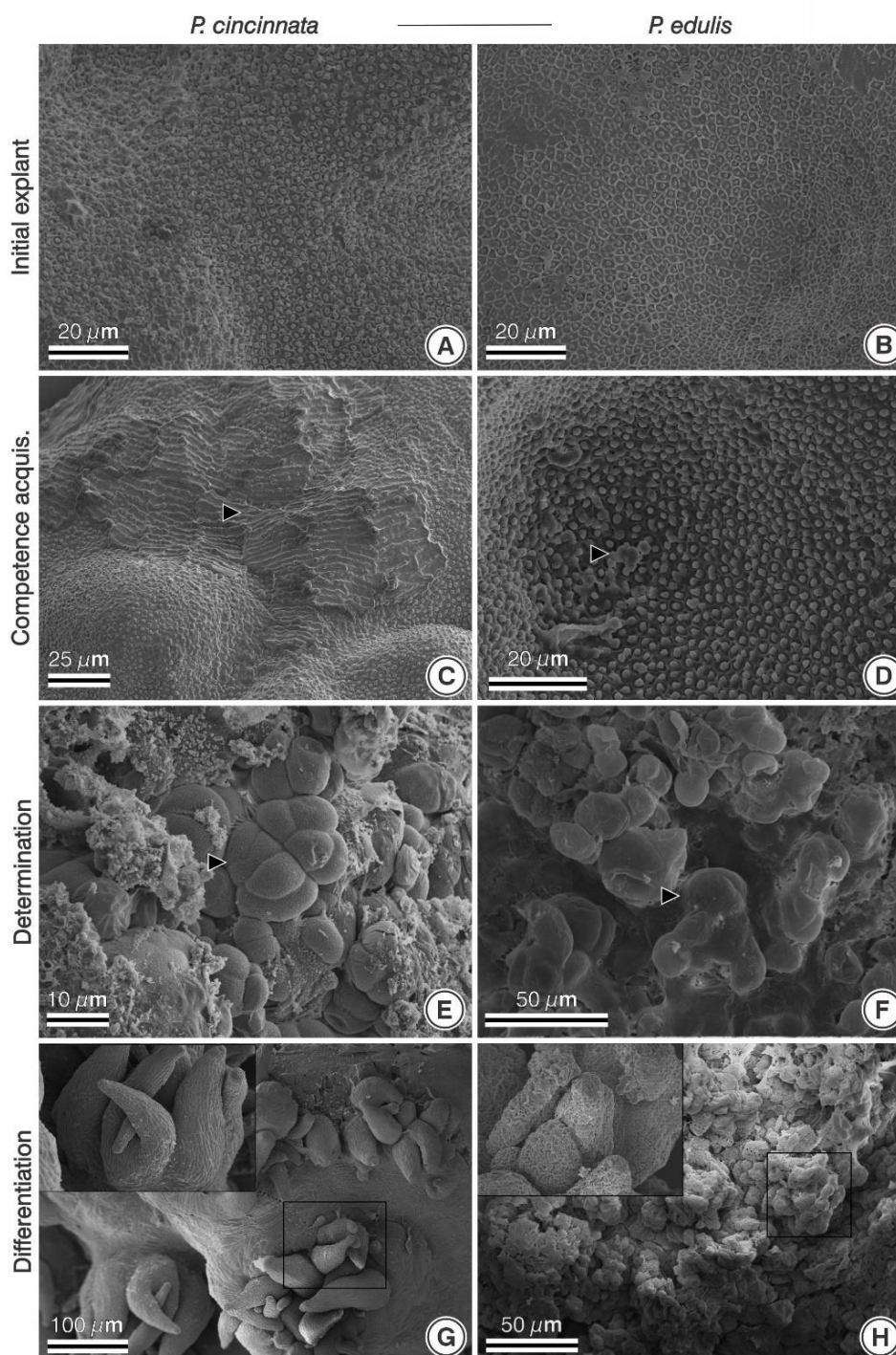


Figura 2: Comparação das respostas morfogênicas do tecido endospermico de *P. cincinnata* (a, c, e, g) e *P. edulis* (b, d, f, h) submetidos a organogênese *de novo* (DNSO) durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Vista de microscopia eletrônica de varredura. Explante inicial (a, b), fase de aquisição de competência (c, d), fase de determinação (e, f), fase de diferenciação (g, h). Note que o explante de *P. cincinnata* apresentou na fase de aquisição de competência alteração na face externa do tecido, indicando atividade morfogênica (cabeça de seta) (c), na fase de determinação é possível observar a presença de meristemóides (cabeça de seta) e no explante aos 30 dias, é possível observar a presença de gemas adventícias desenvolvidas e primórdios foliares (g). Barras: 10 µm (e); 20 µm (a, b, d); 25 µm (c); 50 µm (h); 100 µm (g).

3.3 Mudanças citológicas e estruturais das células dos endospermas durante a indução da organogênese *de novo*

A figura 3 mostra imagem de microscopia de luz. As células do explante inicial de *P. cincinnata* e *P. edulis* eram isodiamétricas e totalmente preenchidas por grandes corpos proteicos e numerosos corpos lipídicos (Fig. 3a, b). Após 5 dias de cultura, os corpos proteicos e corpos lipídicos tornaram-se menores e menos numerosas, as células da extremidade dorsal apresentaram início de alongamento celular, citoplasma denso e nucleolo visível, indicando atividade mitótica (Fig. 3c, d). Com 10 dias de cultivo *in vitro* em *P. cincinnata* observou-se intensa proliferação celular e início da formação de meristemoides. Proteínas e lipídios são totalmente mobilizados (Fig. 3e, f). A diferenciação celular pode ser observada com 15 dias de cultivo em *P. cincinnata*, com a formação de gemas adventícias (Fig. 3g), enquanto em *P. edulis*, aos 15 dias, foi observado o desenvolvimento dos meristemóides. (Fig. 3h) Aos 30 dias de cultivo, em *P. cincinnata*, foi observado a regeneração de parte aérea de plantas triploides a partir do endosperma. Enquanto em *P. edulis* ainda ocorre o desenvolvimento das gemas adventícias, evidenciando a diferença temporal durante a regeneração entre as espécies. (Fig. 3i, j).

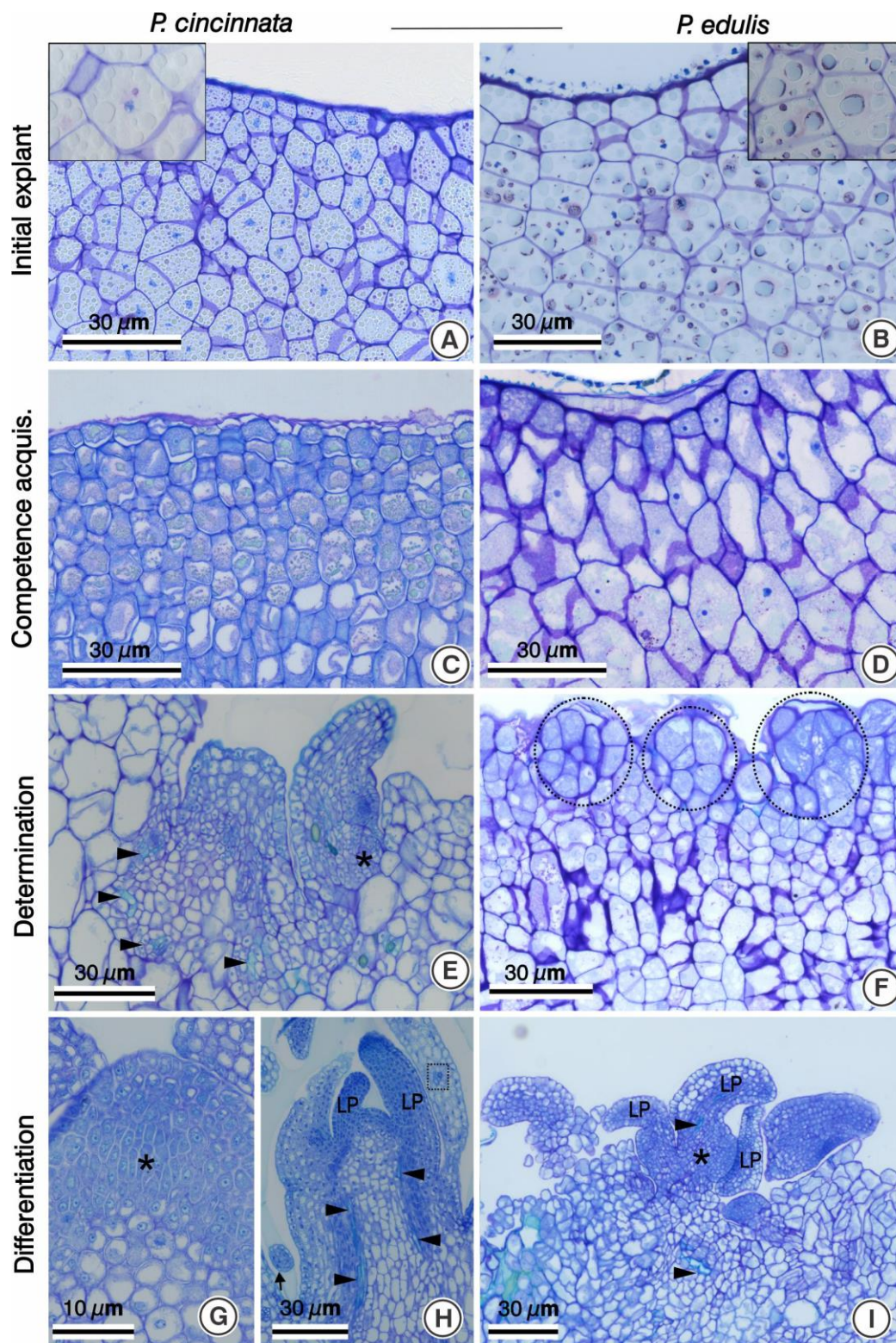


Figura 3: Organogênese de novo (DNSO) induzido a partir de endospermas de *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis*. Secções longitudinais via microscopia de luz. Explante inicial (a, b) fase de aquisição de competência (c, d), fase de determinação (e, f), fase de diferenciação (g, h, i). Na fase de determinação é possível observar no explante de *P. cincinnata* a formação de gemas adventícias com formação de meristema caulinar (*) e primórdios foliares (lp). Note a formação de elementos condutores (cabeça de seta). Barras: a, b, c, d, e, f, h: 30 µm; g: 10 µm.

1172 3.4 Conteúdo de EROs e metabolismo antioxidante

Explantos em fases variadas que abrangeram desde o explante inicial até a fase de diferenciação celular, foram coletados para estudar a possível relação entre a geração de ROS, a formação de gemas adventícias e as diferenças observadas entre a regeneração de *P. edulis* e *P. cincinnata* a partir de endosperma. A concentração de H_2O_2 , O_2 e MDA foi avaliada quantitativamente nos explantes após sua coleta. O gráfico mostra a produção de H_2O_2 no explante inicial, nas fases de aquisição de competências, de determinação e de diferenciação.

A média do conteúdo de MDA no explante inicial não apresentou diferença significativa entre as duas espécies, iniciando com baixa concentração em ambas espécies. Em *P. cincinnata*, não foi observado conteúdo de MDA durante as fases de aquisição de competência. Na fase de determinação *Passiflora edulis* apresentou uma diferença de 36% nas concentrações de MDA em comparação com *Passiflora cincinnata* (Fig. 4a). Na fase de diferenciação, o conteúdo de MDA em *P. cincinnata* subiu 26% em relação a fase de determinação, se igualando estatisticamente a *P. edulis* na fase de diferenciação ($p < 0,05$).

No estágio inicial, o conteúdo de peróxido de hidrogênio nas duas espécies foi semelhante estatisticamente, sendo $2,23 \text{ umol/g}^{-1}$ em *P. cincinnata* e $2,65 \text{ umol/g}^{-1}$ em *P. edulis*. Na fase de aquisição de competência foi observado em *P. cincinnata* um decréscimo de cerca de 101,6% em relação a fase anterior. Nessa fase, a diferença no conteúdo de H_2O_2 entre *P. edulis* e *P. cincinnata* foi de 116,8%. Nas fases seguintes houve aumento na taxa de H_2O_2 em ambas espécies, sem diferença estatística entre as fases (Fig. 4b) ($p > 0,05$).

Foi observado alto conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ no explante inicial de *P. edulis* e *P. cincinnata*, sem diferença significativa entre as duas espécies. Já na fase de aquisição de competência observou-se em *Passiflora cincinnata* uma produção de ânion superóxido 156,9% menor em comparação a *Passiflora edulis*, mantendo a diferença estatística entre a concentração de $O_2^{\cdot-}$ ao longo de todas as fases seguintes de DNSO (Fig. 4c). *P. edulis* não obteve diferença estatística entre as fases ($p > 0,05$).

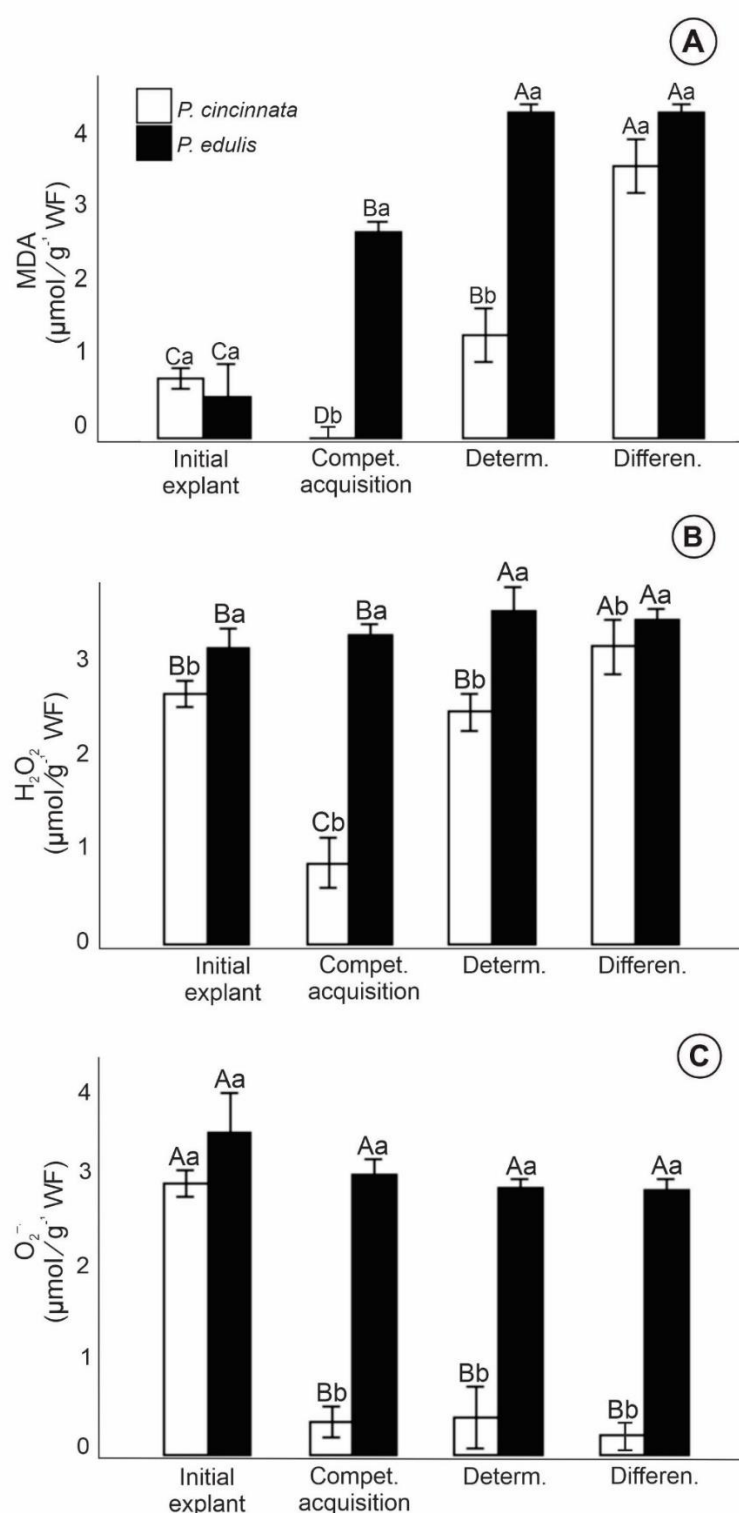


Figura 4 – Malondialdeído—MDA (a), radical ânion superóxido— $O_2^{\cdot-}$ (b), peróxido de hidrogênio— H_2O_2 (c) durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Diferentes letras indicam diferenças de acordo com o teste Scott_Knott. Letras maiúsculas comparam as médias do genótipo nas diferentes fases do processo organogênico, enquanto letras minúsculas comparam as médias entre as diferentes espécies na mesma fase avaliada.

O explante inicial apresentou baixa atividade da POX em ambas espécies (Fig. 5a), permanecendo baixa durante a fase de aquisição de competência. Na fase de determinação, houve aumento de 183% em *P. cincinnata* em relação a fase anterior. Em *P. edulis* houve aumento de 94%. Entre as espécies não houve diferença significativa nessa fase. Durante a fase de diferenciação, *P. cincinnata* e *P. edulis* demonstraram altas atividades de POX, com aumento de 45% em *P. cincinnata* em relação a fase anterior e 27,5% em *P. edulis*. Não houve diferença estatística entre as espécies nessa fase ($p < 0,05$).

O conteúdo de APX no explante inicial não apresentou diferença estatística entre *P. cincinnata* e *P. edulis* (Fig. 5b). Na fase de aquisição de competência, houve uma alta na concentração de APX em 123% em *P. edulis* e de 50% em *P. cincinnata*. Entre as espécies nessa fase *P. edulis* apresentou uma taxa de APX 73,9% a maior que *P. cincinnata*. Na fase de determinação, *P. cincinnata* teve aumento na atividade de APX em 64,4% em comparação a fase anterior. Ao mesmo tempo que em *P. edulis* foi observada uma redução da atividade de APX em 90,2%. Entre as espécies, foi observado em *P. cincinnata* uma concentração de 83% maior em comparação a *P. edulis* na mesma fase. Na fase de diferenciação, ambas as espécies se mantiveram sem diferença estatística em relação a sua fase anterior. Com *P. cincinnata* apresentando concentração de APX 63,4% maior que *P. edulis* ($p < 0,05$).

Para a enzima SOD, não foram observadas diferenças significativas da concentração endógena entre as espécies no explante inicial e na fase de aquisição de competência. No entanto, foi observada diferença na taxa de SOD entre *P. edulis* e *P. cincinnata* na fase de determinação (49,1%) e na fase de diferenciação (43,4%), do qual *P. edulis* obteve a maior média em ambos os casos (Fig. 5c) ($p < 0,05$).

Na fase inicial, não houve diferença estatística entre *P. cincinnata* e *P. edulis* (Fig. 5d). Em ambas espécies não foi observado flutuações consideráveis na concentração de CAT ao decorrer das fases. Em duas das fases *P. edulis* apresentou concentração maior de CAT, sendo 66,3% na fase de aquisição de competência e 91,1 % fase de diferenciação, em relação a *P. cincinnata* ($p > 0,05$).

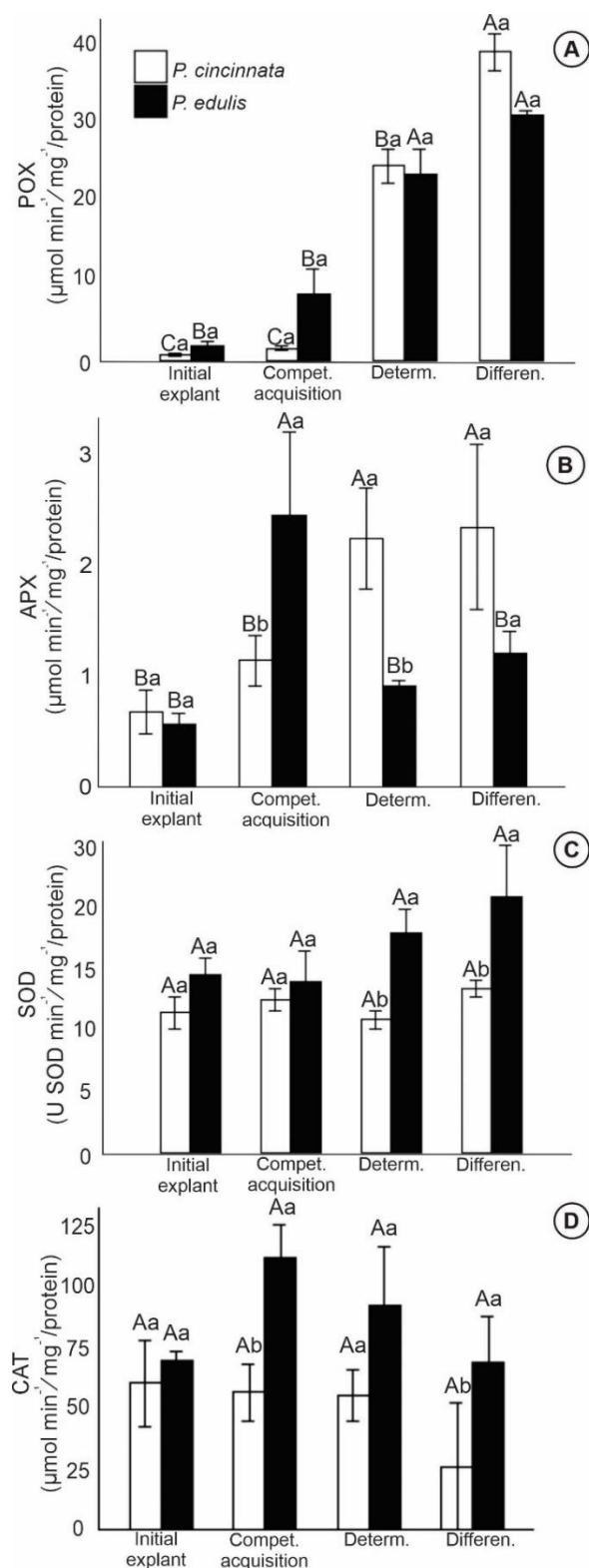


Figura 5 - Peroxidase—POX (a), Ascorbato Peroxidase—APX (b), Superoxido dismutase—SOD (c), catalase—CAT (d). Letras maiúsculas comparam as médias do genótipo nas diferentes fases do processo organogênico, enquanto letras minúsculas comparam as médias entre as diferentes espécies na mesma fase avaliadas de acordo com o teste Scott_Knott.

1203 3.5 Perfil hormonal de explantes organogênicos durante a organogênese de 1204 novo

O ácido indolacético (IAA) é uma auxina que, apresentou maior concentração no explante inicial, havendo uma redução gradual ao longo das fases de desenvolvimento tanto em *P. edulis* quanto em *P. cincinnata* (Fig. 6a) ($p < 0,05$). A concentração da zeatina, uma citocinina, se manteve o mesmo em *P. cincinnata* durante todas as fases, enquanto *P. edulis* teve uma alta na concentração durante a fase de determinação (Fig. 6d) ($p < 0,05$). Em ambas espécies, no explante inicial foi detectado metil jasmonato (MeJa), não havendo mudanças consideráveis na concentração desse hormônio ao longo dos dias de cultivo (Fig. 6c) ($p < 0,05$). O ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), precursor do Etileno, se manteve baixo em todas as fases da regeneração em *P. cincinnata*. Em *P. edulis*, durante a fase de determinação houve aumento considerável na concentração desse ácido, indicando alta na produção do etileno (Fig. 6d) ($p < 0,05$). As maiores concentrações de ácido salicílico foram observadas no explante inicial de ambas espécies, ocorrendo uma drástica redução durante as fases de regeneração (Fig. 6e) ($p < 0,05$). O ácido jasmônico (JA) apresentou baixas concentrações em todas as fases de *P. cincinnata*. Em *P. edulis* houve aumento da concentração na fase de determinação (Fig. 6f) ($p < 0,05$). A concentração do ácido abscísico (ABA) se manteve sem flutuações consideráveis em *P. cincinnata*, enquanto em *P. edulis* foi maior no explante inicial (Fig. 6g) ($p > 0,05$). As taxas do brassinosteroides (BRA) se mantiveram constantes em *P. edulis*, já em *P. cincinnata* teve alta na fase de determinação (Fig. 6h) ($p < 0,05$).

1205

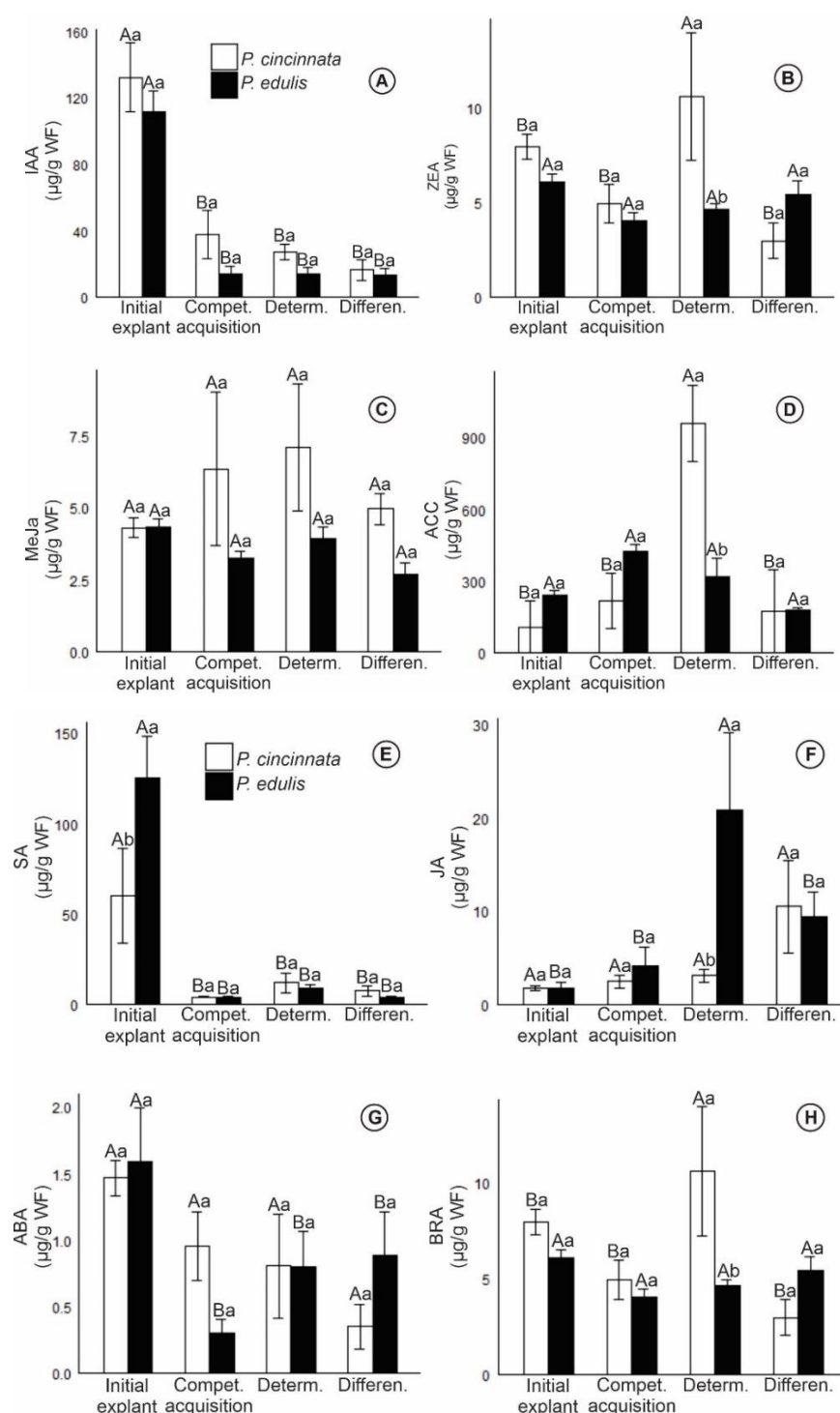


Figura 6. Quantificação de hormônios endógenos nos explantes endospermicos de *P. edulis* e *P. cinnnata* submetidos à organogênese *de novo* (DNSO). Quantificação de ácido indolacético (IAA) (a), zeatina (ZEA) (b), metil jasmonato (MeJa) (c), ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) (d), ácido salicílico (SA) (e), ácido jasmônico (JA) (f), ácido abscísico (ABA) (g) e brassinosteroides (BRA) (h). Letras maiúsculas comparam as médias do genótipo nas diferentes fases do processo organogênico, enquanto letras minúsculas comparam as médias entre as diferentes espécies na mesma fase avaliadas de acordo com o teste Scott_Knott.

4 DISCUSSÃO

4.1 Endosperma derivado de *P. cincinnata* apresentou maior avanço na regeneração *in vitro* em comparação a *P. edulis*

A organogênese *de novo* (DNSO) refere-se à habilidade de iniciar um processo completo de formação de gemas após a fase embrionária (Hnatuszko-Konka et al., 2021). Endospermas de *P. cincinnata* e *P. edulis* inoculados em meio de indução foram capazes de produzir gemas adventícias, sendo observado em *P. cincinnata* maior sucesso na regeneração em comparação a *P. edulis* (Silva et al., 2020; Antoniazzi et al., 2018, da Silva et al., 2011; Dias et al., 2009). No presente estudo, durante a fase de aquisição de competência, que ocorre a partir dos 5 dias, as células da face externa do endosperma de *P. cincinnata* apresentaram alterações morfológicas, como o esverdeamento em consequência da formação de cloroplastos. Neste mesmo período o endosperma *P. edulis* apresentou sinais de embranquecimento. Entre 10 e 15 dias, nesse presente estudo foi observado em *P. cincinnata* a formação de meristemóides e aos 30 dias a formação de gemas adventícias e primórdios foliares. Silva et al., (2020) identificaram estruturas nodulares organogênicas com 10 dias após a inoculação de explantes endospermicos de *P. cincinnata* e, após 30 dias de cultivo, os brotos desenvolveram-se em gemas adventícias. Em comparação, aos 10-15 dias, *P. edulis* apresentou início do esverdeamento e formação de estruturas características de DNSO e aos 30 dias apresentou formação de estruturas nodulares organogênicas, evidenciando a diferença espaço-temporal de resposta dessas duas espécies de maracujazeiros.

No presente estudo, cortes histológicos demonstraram a iniciação das vias de DNSO a partir das células da face externa do endosperma de *P. cincinnata*, indicando a formação de protuberâncias precedendo os primórdios adventícios. Tang et al., (2024) observaram respostas morfológicas em explantes de *Passiflora edulis* após 15-20 dias de incubação com meios enriquecidos com citocininas, das quais, com o uso de TDZ, houve emergência acelerada de pontos de brotação. Antoniazzi et al., (2018) observaram a formação de estruturas organogênicas a partir dos 10 dias de cultivo em *P. cincinnata* a partir do uso de BA. Endospermas induzidos ao processo de regeneração via organogênese *de novo* sob suplementação de BA, exibiram um padrão de comportamento celular caracterizado por alongamento celular significativo e divisão celular gradual, resultando em aumento da área celular e redução da densidade celular. Citocininas, como a BA, são reconhecidas por sua capacidade de

estimular a divisão celular em tecidos vegetais (Breuer, Ishida, & Sugimoto, 2010; Kieber & Schaller, 2014). Antoniazzi et al., (2020) identificaram estruturas nodulares organogênicas com 10 dias após a inoculação de explantes endospermicos de *P. cincinnata* e, após 30 dias de cultivo, os brotos desenvolveram-se em gemas adventícias. Em comparação, aos 10-15 dias, *P. edulis* apresentou formação meristemóides e aos 30 dias formação de gemas adventícias menos desenvolvidas quando comparadas a *P. edulis*. As gemas induzidas em meio contendo TDZ não apresentaram alongamento, resultando em brotos fasciados e distorcidos. Esse comportamento também foi observado em outras espécies vegetais (Faisal et al., 2005; Siddique et al., 2006; Siddique & Anis, 2007; Husain et al., 2007; Varshney & Anis, 2011).

4.2 Elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio indicam maior estresse oxidativo em *P. edulis*, contrastando com *P. cincinnata*, que exhibe adaptação mais rápida ao longo das fases de regeneração

Concentrações elevadas de $O_2^{\cdot-}$ foram observadas no explante inicial de *P. edulis* e *P. cincinnata*, provavelmente devido à produção local de $O_2^{\cdot-}$ como resposta ao estresse mecânico causado durante o corte do material para a retirada do embrião e sua transferência para o meio de cultura (Prasad et al., 2020; Minibayeva et al., 2009). Em contraste a *P. cincinnata*, no qual houve diminuição nas fases seguintes, em *P. edulis* notou-se alta concentração de $O_2^{\cdot-}$ durante todas as fases. Esse fato pode indicar alta taxa de estresse e, conseqüente, diminuição da eficiência da regeneração em resposta ao $O_2^{\cdot-}$ (Benson 2000). O superóxido converte o íon férrico em ferroso, que posteriormente reage com H_2O_2 , originando radicais hidroxila altamente reativos ao DNA (Kyle e Farber, 1991). Para mitigar esse efeito, as células ativam mecanismos que produzem eliminadores de EROs, como a SOD, que desempenha um papel crucial na prevenção da oxidação das membranas e na proteção das moléculas biológicas contra danos (Faisal e Anis, 2009).

SODs são metaloenzimas que catalisam a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (Filipović et al., 2014). Em ambas espécies a atividade de SOD permanece sem variação durante todas as fases. Guo et al., (2017) observaram que a superexpressão de SODs pode levar à proteção contra estresses oxidativo e diminuição na concentração de H_2O_2 durante a organogênese dos brotos

em explantes de *Saussurea involucrate* tratados com TDZ. Em comparação a *P. edulis*, *P. cincinnata* apresentou menor atividade de SOD nas fases de determinação e diferenciação. Nestas mesmas fases, a atividade de $O_2^{\cdot -}$ apresentou redução em *P. cincinnata*, enquanto em *P. edulis* permaneceu elevada.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em baixas concentrações pode atuar como uma molécula sinalizadora que promove o crescimento e a divisão celular, enquanto em concentrações mais altas pode induzir a senescência celular e até a morte celular programada (Goncharuk et al., 2022). Neste presente estudo, foi observado alta concentração de peróxidos em todas as fases de desenvolvimento de *P. edulis*, destacando a diferença observada entre *P. edulis*, alta concentração, e *P. cincinnata* baixa concentração, durante a fase de aquisição de competência, fase essa crucial para reprogramação celular e para a DNSO (Cassells & Curry, 2001). Isso pode significar que, em *P. edulis*, o H_2O_2 estava causando estresse oxidativo, enquanto em *P. cincinnata* foi detectado baixa concentração, indicando ação de sinalização celular, contribuindo para a aquisição de competência devido sua característica de induzir o crescimento e divisão celular (Smirnoff & Arnaud, 2018).

O aumento da concentração da APX e POX em *P. cincinnata* coincidiu com o aumento da concentração de H_2O_2 ao longo das fases. Durante a fase de determinação e diferenciação, as células em regeneração podem gerar quantidades significativas de peróxido de hidrogênio, inevitavelmente produzidas como subprodutos de processos metabólicos intensificados, como a decomposição do ânion superóxido pela SOD, incluindo a respiração celular e em decorrer da diferenciação celular (Geret et al., 2009).

A catalase (CAT) é uma enzima que converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (O_2) (Gill & Tuteja, 2010). A presença de alta concentração de CAT no explante inicial de ambas espécies sugere que os explantes foram expostos a condições de estresse que causaram a geração imediata de H_2O_2 (Blokhina et al., 2003). As enzimas catalases têm taxas catalíticas máximas extremamente altas, mas baixas afinidades com o substrato, uma vez que a reação requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 ao sítio ativo (Noctor & Foyer, 1998), o que pode explicar a necessidade de altas concentrações durante as fases de regeneração em ambas espécies.

As peroxidases (POX) têm uma variedade de isoformas que têm diferentes funções fisiológicas e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (Keck

2002, Halliwell & Gutteridge 2007). Durante o cultivo, os explantes passam por processos de desenvolvimento que incluem divisão celular, expansão celular e diferenciação. As POX estão envolvidas em vários desses processos, incluindo a lignificação da parede celular (Francoz et al., 2015). As peroxidases também aumentam gradualmente ao longo das fases em ambas as espécies, isso pode estar associado ao desenvolvimento do explante. À medida que os explantes se aclimata no meio de cultura, a demanda por respostas antioxidantes mais diversificadas e especializadas aumentam. As POX desempenham papéis específicos na remoção de H_2O_2 e na regulação do ambiente redox celular (Imran & Hussain, 2019). O aumento gradual da concentração de POX ao longo dos dias reflete a adaptação das células, onde há uma necessidade crescente de enzimas que possam lidar com a produção contínua de H_2O_2 e outras EROs.

A ascorbato peroxidase (APX), uma enzima peroxidase, reduz H_2O_2 em água convertendo ascorbato (AsA) em monodeidroascorbato (Shafi et al., 2015). Em células vegetais, um dos substratos redutores mais importantes para a desintoxicação de H_2O_2 é o ascorbato (Li, 2023). O aumento gradual da APX ao longo dos dias de cultivo em *P. cincinnata* sugere uma adaptação mais específica e eficiente das células em resposta ao estresse oxidativo contínuo e ao desenvolvimento do tecido ao longo do processo de regeneração. Enquanto em *P. edulis*, ocorre uma alta brusca da concentração de APX na fase de aquisição de competência, mesma fase em que tem alta na concentração de malondialdeído (MDA), indicando aumento da taxa de peroxidação lipídica e consequente necessidade de incremento da célula na maquinaria antioxidativa.

1307 **4.3 Diferenças na concentração de hormônios vegetais influenciam a eficiência**
1308 **de regeneração em *P. edulis* e *P. cinnamomum* durante as fases de regeneração *in***
1309 ***vitro* a partir do endosperma**

Neste estudo, procuramos associações entre os níveis de hormônios endógenos e sua capacidade de regeneração em explantes derivados de endosperma de *P. cinnamomum* e *P. edulis*. Há muito se sabe que a capacidade de regeneração de um explante está fortemente correlacionada com a concentração de hormônio endógeno e/ou hormônios aplicados ao meio de cultura. O equilíbrio hormonal e a interação entre auxina e citocinina são fundamentais para a determinação do destino celular e a padronização celular durante a regeneração *in vitro* (Cheng et al., 2013).

As auxinas e as citocininas atuam como gatilho morfogênico e reguladores essenciais dos principais processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (Benková et al., 2009; Werner et al., 2001). Skoog and Miller publicaram o trabalho importantíssimo sobre a regulação química do crescimento vegetal na cultura de tecidos (Skoog & Miller, 1957). Eles documentaram que os hormônios auxina e a citocinina eram necessários para a proliferação celular e seus efeitos variavam quantitativamente, de forma que fenótipos morfológicos muito diferentes poderiam ser formados a depender da concentração de cada um desses hormônios (Skoog & Miller, 1957). Alta concentração de citocinina e baixa concentração de auxina promove a formação de brotos e brotos a partir de calos. Da mesma forma, alta concentração de citocinina e baixa de auxina promove a formação de calos. Além disso, Skoog e Miller observaram que a citocinina induziu a formação de brotos, ao mesmo tempo que a auxina reprimiu (Skoog & Miller, 1957). Isso está relacionado ao fato de que os aumentos da concentração de citocinina ativa a expressão de *WUSCHEL* e *SHOOT MERISTEMLESS*, reguladores positivos do destino das células do meristema apical caulinar (Gordon et al., 2009; Rupp et al., 1999). A superexpressão de *WUSCHEL* e *STM* é o bastante para formar brotos apicais (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002), sendo provável que a citocinina induza a formação de brotos a partir dessa via. Neste presente estudo, maiores concentrações de auxina foram encontradas apenas nos explantes iniciais de ambas espécies, sendo observados níveis mais baixos ao longo do progresso do desenvolvimento organogênico. Ao observarmos as concentrações de citocinina (ZEA), foi constatado que não houve variação em *P. edulis* durante todos os dias de cultivo, enquanto em *P. cinnamomum*

houve um pico de citocinina na fase de determinação de competência. Esse pico pode ter sido determinante para o maior sucesso de regeneração de brotos em *P. cincinnata* (Gallois et al., 2002).

A auxina e a citocinina exógenas utilizadas para induzir gemas adventícias demonstraram estimular a produção do hormônio gasoso etileno, induzindo ou modificando enzimas biossintéticas específicas (Tsuchisaka e Theologis 2004, Vogel et al., 1998). Em *P. cincinnata*, a alta na concentração de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), um composto orgânico que atua como um intermediário crucial na biossíntese do etileno, teve alta na concentração endógena de *P. cincinnata* na fase de determinação de competência, assim como citocinina (ZEA). Dias et al. (2009) observaram que as respostas morfogênicas de *P. cincinnata* coincidiu com altos níveis de etileno, e picos desse hormônio foram registrados durante a diferenciação de meristemóide. E além disso, concluíram que o atraso na formação de brotos em *P. edulis* também seguiu o padrão de atraso associado ao aumento na produção de etileno. A partir dessa observação é possível inferir que a alta de etileno na fase de determinação de competência possa ter contribuído para uma maior eficiência de regeneração em *P. cincinnata*.

Os jasmonatos, como o ácido jasmônico (JA) e seus derivados, incluindo o metil jasmonato (MeJA), são moléculas de sinalização produzidas nas plantas através da oxidação do ácido α -linolênico que é liberado das membranas plastidiais pela ação de lipases em resposta a ferimentos, ataques de insetos e patógenos (Wasternack & Hause, 2013). Sabe-se também que os níveis de jasmonatos aumentam em resposta a fatores abióticos que causam estresse oxidativo (Wasternack & Hause, 2013; Creelman & Mullet, 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2005). Em ambas as espécies estudadas, observou-se que as concentrações de MeJA permaneceram elevadas desde o explante inicial até as fases subsequentes de regeneração, sugerindo seu papel na ativação de genes de defesa contra o estresse oxidativo. Já o ácido jasmônico (JA) teve baixa concentração no explante inicial e nas fases seguintes em *P. cincinnata*, o mesmo foi observado em *P. edulis*, com exceção da fase de determinação, no qual houve um pico de JA, indicando alto nível de estresse oxidativo nessa fase (Wasternack & Hause, 2013) contribuindo para o retardo da determinação de competência nessa espécie.

A concentração de Ácido Abscísico (ABA) foi relativamente baixa durante todas as fases de desenvolvimento em ambas espécies. Em *P. cincinnata* não houve

variação considerável ao longo dos dias de cultivo. Já em *P. edulis*, houve uma queda na taxa desse hormônio nas fases de aquisição de competência, determinação e diferenciação comparado ao explante inicial. Dias et al., (2024) também observou baixa concentração de ABA durante a indução e formação de calos embriogênicos a partir de explantes de embrião zigótico em *P. edulis*. Esse fato indica que este hormônio não está relacionado a indução de morfogênese.

O ácido salicílico (SA) aparece em alta concentração no explante inicial de ambas espécies, ocorrendo uma queda brusca na taxa desse hormônio em todas as fases subsequentes de cultivo tanto em *P. cincinnata*, quando em *P. edulis*. A alta do SA no explante inicial pode ter relação com a ativação da via desse hormônio associado ao estresse causado por ferimento ao remover o embrião zigótico e isolar o endosperma utilizado como explante no meio de cultura (Ogawa et al., 2020) mas ainda não está claro dos envolvimento dessas vias na regeneração de órgãos.

De acordo com Sharma et al., (2022), os brassinosteroides (BRA) podem provocar respostas à proteínas de ligação ao cálcio (CBPs), desempenhando um papel fundamental em vias de sinalização como a família de transportadores ABC, PIN-LIKES7, LTPs, transportadores de açúcares e potássio e genes de resposta à auxina e ERFs. No presente estudo, foi observado a presença de BRA em todas as fases de desenvolvimento do explante. Em *P. edulis* não houve oscilações consideráveis dentre as fases de desenvolvimento. Enquanto em *P. cincinnata* houve um pico de BRA na fase de determinação. Em arroz foi relatado que o cross-talk entre BRA e outras hormônios promove processos de desenvolvimento, incluindo a embriogênese somática (Zhang 2009).

A figura 7 sumariza os principais resultados descritos aqui. Acreditamos que esses achados contribuem para a elucidação dos mecanismos celulares e fisiológicos envolvidos na indução de organogênese *de novo* a partir de endospermas de *P. edulis* e *P. cincinnata*. Dados como esses, poderão auxiliar pesquisas relacionadas com a otimização de processos que envolvam a regeneração de maracujazeiros e de outras espécies filogeneticamente próximas.

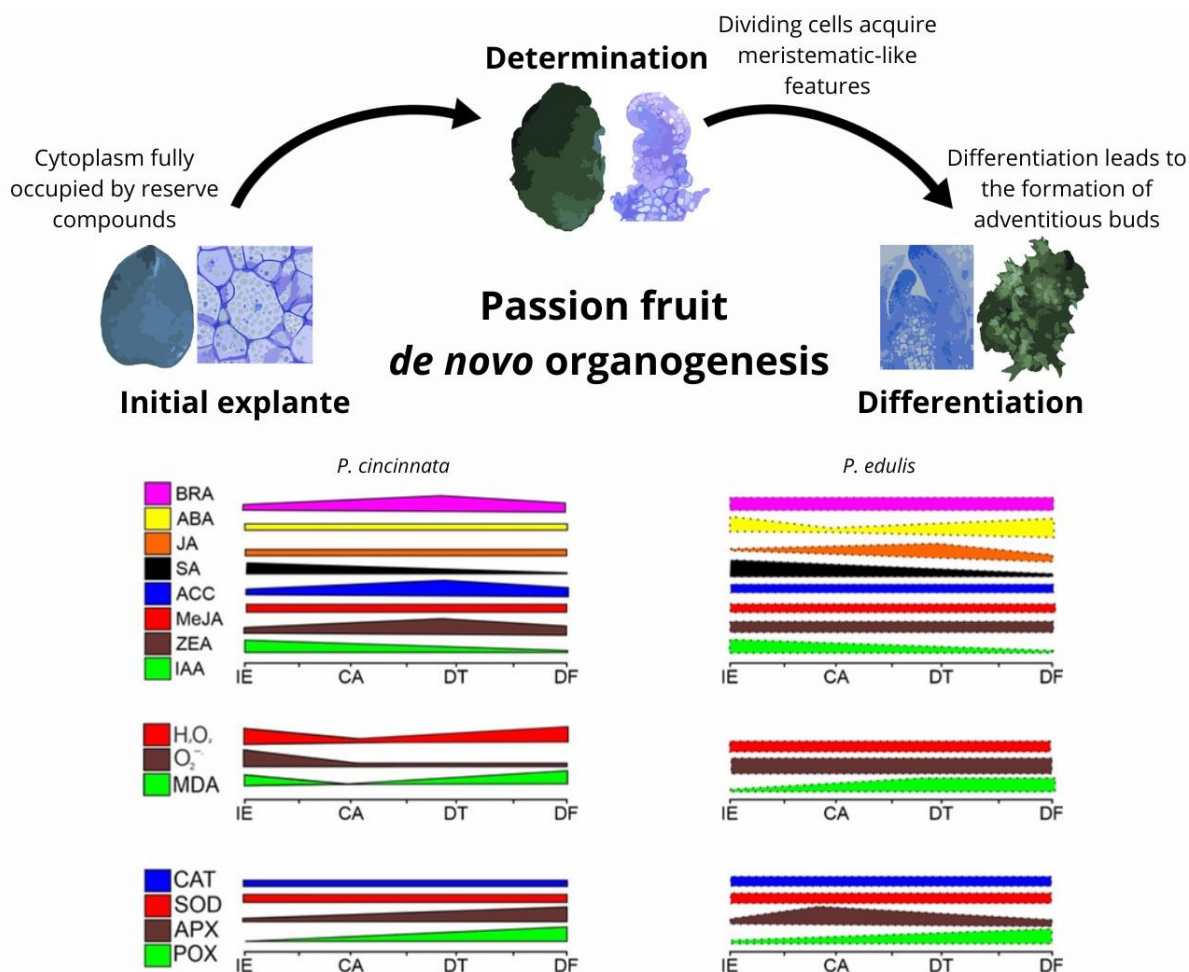


Figura 7. Diagrama esquemático resumindo os principais eventos morfofisiológicos que ocorrem durante a regeneração a partir de endosperma em *P. cinnamomum* e *P. edulis* via organogênese *de novo*. Observa-se a dinâmica do metabolismo oxidativo e dos fitohormônios durante o processo organogênico. Abreviações: IE (Initial explant), CA (Competence acquisition), DT (Determination), DF (Differentiation).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou diferenças significativas na eficiência de regeneração *in vitro* entre endospermas de *P. cinnamomum* e *P. edulis*, destacando *P. cinnamomum* como a espécie com maior potencial regenerativo. O maior potencial de regeneração de *P. cinnamomum* está associado a rápida adaptação ao estresse oxidativo e a regulação hormonal mais precisa e eficaz durante as fases críticas da regeneração.

O estudo demonstrou que *P. cinnamomum* apresentou concentrações mais baixas de espécies reativas de oxigênio (EROs) ao longo do processo de regeneração, sugerindo uma menor exposição ao estresse oxidativo. Além disso, picos de citocinina (ZEA) e etileno foram observados durante a fase de determinação de competência em

1376 *P. cincinnata*, favorecendo a formação e o desenvolvimento de gemas adventícias
1377 nessa espécie. Em contrapartida, *P. edulis* mostrou uma maior concentração de EROs
1378 e um perfil hormonal sem picos de hormônios cruciais para em fases determinantes
1379 para o processo de regeneração, fatores que parecem ter dificultado a determinação
1380 de competência e a subsequente regeneração.

1381 Esses achados sugerem que a capacidade regenerativa dos explantes está
1382 fortemente correlacionada com o equilíbrio entre as respostas antioxidantes e a
1383 regulação hormonal. A compreensão mais profunda dessas interações em *P.*
1384 *cincinnata* e *P. edulis* pode fornecer *insights* importantes para a otimização de
1385 protocolos de regeneração *in vitro* em *Passiflora*.

1386
1387
1388

6 REFERÊNCIAS

- Alché, J. D., (2019) **A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants.** *Redox Biology*, Volume 23, 2019, 101136, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>.
- Antoniuzzi CA, Faria RB, Carvalho PP, Mikovski AI, Carvalho IF, Matos EM, Reis AC, Viccini LF, Paim Pinto DL, Rocha DI, Otoni WO, Silva ML (2018) ***In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims).** *Sci Hortic* 238: 408-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.001>.
- Benson, E.E., (2000). **Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance?.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 36, 163–170.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). **Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review.** *Annals of Botany*, 91 Spec No(2), 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Boveris, A., Alvarez, S., Bustamante, J., Valdez, L., (2002) **Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles.** *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 280–287. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)49342-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)49342-1)
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Breuer, C.; Ishida, T.; Sugimoto, K., (2010) **Developmental control of endocycles and cell growth in plants.** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, n. 6, p. 654–660.
- Cassells, A.C., Curry, R.F., (2001). **Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 145–157. <https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>
- Cheng, Z.J., Wang, L., Sun, W., et al.,(2013). **Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3.** *Plant Physiology* 161, 240–251.

- Creelman, R.A. and Mullet, J.E., (1995). **Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress**, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 92, pp. 4114–4119.
- 1409 da Silva, N.T., Silva, L.A.S., Reis, A.C. *et al.*, (2020). **Endosperm culture: a facile**
 1410 **and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora***
 1411 ***cincinnata* Mast.) triploid plants**. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 142, 613–
 1412 624. [https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-020-01887-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-020-01887-2)
 1413 2.
- Dhabhai, K., & Batra, A. (2010). **Impacto da regulação hormonal na regeneração de *Acacia nilotica* L., uma árvore fixadora de nitrogênio**. *World Applied Sciences Journal*, 11 (9), 1148-1153.
- Dias, L.L.L, Silva, L.A.S, Vieira, L.M *et al.* (2024). **The dynamics of sugars, hormones and cell wall epitopes dictate early somatic embryogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)**. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 157 , 20. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02733-5>
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., (2005). **Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron**. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 80:187–190
- 1414 Farmer, E.E., Mueller, M.J. (2013). **ROS-mediated lipid peroxidation and RES-**
 1415 **activated signaling**. *Annual Review Plant Biology*, 64 (2013), pp. 429-450,
 1416 10.1146/annurev-arplant-050312-120132
- Filipović, B.K., Simonović, A.D., Trifunović, M.M., *et al.* (2015). **Plant regeneration in *Centaurea erythraea* Rafn leaf culture. Part 1: The role of antioxidant enzymes**. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 121 , 703–719 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0740-4>
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., & Dunand, C. (2015). **Funções das peroxidases da parede celular no desenvolvimento das plantas**. *Phytochemistry*, 112, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.020>
- 1417 Gallois, J. L., Woodward, C., Reddy, G. V., & Sablowski, R. (2002). **Combined**
 1418 **SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis**
 1419 **in *Arabidopsis***. *Development*, 129, 3207–3217.
- 1420 Gay, C., Gebicki, J.M. (2000) **A critical evaluation of the effect of sorbitol on the**
 1421 **ferric–xylenol orange hydroperoxide assay**. *Analytical Biochemistry*

- 1422 284:217–220.<https://doi->
 1423 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1006/abio.2000.4696](https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696).
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J. (2002). **Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus***. *Biomarkers*. May-Jun;7(3):242-56. doi: 10.1080/13547500210125040.
- 1424 Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., (1977). **Superoxide dismutases: I. occurrence in**
 1425 **higher plants**. *Plant Physiology* 59:309–314. <https://doi->
 1426 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1104/pp.59.2.309](https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309)
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants**. *Plant Physiology and Biochemistry* : PPB, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Goncharuk, E.A.; Zubova, M.Y.; Nechaeva, T.L.; Kazantseva, V.V.; Gulevich, A.A.; Baranova, E.N.; Lapshin, P.V.; Katanskaya, V.M.; Aksenova, M.A.; Zagoskina, N.V., (2022). **Effects of Hydrogen Peroxide on *In Vitro* Cultures of Tea (*Camellia sinensis* L.) Grown in the Dark and in the Light: Morphology, Content of Malondialdehyde, and Accumulation of Various Polyphenols**. *Molecules* , 27, 6674. <https://doi.org/10.3390/molecules27196674>
- Guo, B., He, W., Zhao, Y. et al., (2017). **Changes in endogenous hormones and H₂O₂ burst during shoot organogenesis in involucreted explants of *Saussurea* treated with TDZ**. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 128 , 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1069-3>
- Gupta, S. D. (2010). **Role of free radicals and antioxidants in *in vitro* morphogenesis**. In **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants** (pp. 245-264). *CRC Press*.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. Oxford University Press, New York.
- 1427 Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Anee TI, Parvin K, Nahar K, Mahmud JA, Fujita M.
 1428 (2019). **Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating**
 1429 **Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress**. *Antioxidants*; 8(9):384.
 1430 <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>

- 1431 Havir, E. A., McHale, N. A., (1987). **Biochemical and Developmental**
 1432 **Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves**, *Plant*
 1433 *Physiology*, Volume 84, Issue 2, June, Pages 450–
 1434 455, <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- 1435 Heath, R.L. and Packer, L. (1968) **Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I.**
 1436 **Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation.** *Archives of*
 1437 *Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
 1438 [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hnatuszko-Konka, K.; Gerszberg, A.; Weremczuk-Jeżyna, I.; Grzegorzczak-Karolak, I.
Cytokinin Signaling and De Novo Shoot Organogenesis. *Genes* 2021, 12,
 265. <https://doi.org/10.3390/genes12020265>
- Husain, M.K., Anis, M., Shahzad, A., (2007) **In vitro propagation of Indian Kino**
(*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular &*
Developmental Biology – Plant, 43:59–64
- Imran, M., Sun, X., Hussain, S. et al., (2019). **Molybdenum-induced effects on**
nitrogen metabolism enzymes and elemental profile of winter wheat
(*Triticum aestivum* L.) under different nitrogen sources. *International*
Journal of Molecular Sciences. 20: 3009.
- 1439 Kar, M., Mishra, D.; (1976). **Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase**
 1440 **Activities during Rice Leaf Senescence**, *Plant Physiology*, Volume 57, Issue
 1441 2, February 1976, Pages 315–319, <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Keck, M., Richter, S., Suarez, B., Kopper, E. and Jungwirth, E. (2002). **Activity of**
peroxidases in plant material infected with erwinia amylovora. *Acta Hort.*
 590, 343-350 DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.51
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.51>
- Kieber, J. J.; Schaller, G. E., (2014). **Cytokinins.** *The Arabidopsis Book*, v. 12, p.
 e0168.
- Li, S. (2023). **Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher**
plants: More than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biology*, 64, 102789.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102789>
- Li, T., Lei, W., He, R., Tang, X., Han, J., Zou, L., ... & Zhang, D. (2020).
Brassinosteroids regulate root meristem development by mediating BIN2-
UPB1 module in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 16(7), e1008883.

- Liu, J. W., Deng, D. Y., Yu, Y., Liu, F. F., Lin, B. X., Cao, Y. J., ... & Wu, J. Z. (2015). **In situ detection of salicylic acid binding sites in plant tissues.** *Luminescence*, 30(1), 18-25.
- 1442 Machado, M.D., Souza, C.S., Machado, M. *et al.*, (2022). **Novel avenues for passion**
 1443 **fruit *in vitro* regeneration from endosperm culture, and morpho-**
 1444 **agronomic and physiological traits of triploid *Passiflora cincinnata* Mast.**
 1445 **emblings.** *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 150, 637–650. [https://doi-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-022-02318-0)
 1446 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-022-02318-0](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-022-02318-0).
- Mathew, M.M., Ganguly, A. and Prasad, K. (2024), **Multiple feedbacks on self-**
organized morphogenesis during plant regeneration. *New Phytologist*, 241:
 553-559. <https://doi.org/10.1111/nph.19412>
- 1447 Mikovski, A. I.; Silva, N.T; Silva, L. A. S; Machado, M.; Barbosa, L. C. S.; Reis, A. C.;
 1448 Matos, E. M.; Viccini, L. F.; et all. (2021). **From endosperm to triploid plants:**
 1449 **a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and**
 1450 **morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora***
 1451 ***foetida* L.).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,
 1452 <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02120-4>.
- Minibayeva, F.; Kolesnikov, O.; Chasov, A.; Beckett, R.P.; Luthje, S.; Vylegzhanina, N.; Buck, F.; Bottger, M. (2009). **Wound-induced apoplastic peroxidase activities: Their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species.** *Plant, Cell & Environment*. 32, 497–508.
- 1453 Mohammadi, M., Karr, A.L., (2001) **Superoxide anion generation in effective and**
 1454 **ineffective soybean root nodules.** *Journal of Plant Physiology*, 158:1023–
 1455 1029. [https://doi.org/10.1078/S0176-1617\(04\)70126-1](https://doi.org/10.1078/S0176-1617(04)70126-1)
- 1456 Murashige T, Skoog F (1962) **A revised medium for rapid growth and bio assays**
 1457 **with tobaccotissue cultures.** *Physiology Plant* 15:473-497
- 1458 Nakano, Y., & Asada, K. (1981). **Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-**
 1459 **specific peroxidase in spinach chloroplasts.** *Plant and cell*
 1460 *physiology*, 22(5), 867-880.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). **Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control.** *Annual Review of Plant Biology*, 49, 249-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>

- 1461 Ogawa, E., Ara, E., Aoki E., Suzuki, O., Shibata E., (2010). **Transient increase in**
 1462 **salicylic acid and its glucose conjugates after wounding in Arabidopsis**
 1463 **leaves.** *Plant Biotechnology* 27:205–209
- Prasad, A.; Sedlářová, M.; Balukova, A.; Rác, M.; Pospíšil, P., (2020). **Reactive**
oxygen species as a response to wounding: In vivo imaging
in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1660.
- R Core Team (2024). **R: A Language and Environment for Statistical Computing.**
R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <[https://www.R-](https://www.R-project.org/)
[project.org/](https://www.R-project.org/)>.
- Raspor, M.; Motyka, V.; Kaleri, AR; Ninković, S.; Tubić, L.; Cingel, A.; Ćosić, T. (2021).
Integrating the roles of cytokinin and auxin in de novo shoot
organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs. *International*
Journal of Molecular Sciences, 22 , 8554.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168554>
- 1464 Ribeiro, C., Cambraia, J., Peixoto, P.H.P., Fonseca, J. (2012) **Antioxidant system**
 1465 **response induced by aluminum in two rice cultivars.** *Brazilian Journal of*
 1466 *Plant Physiology*, 4:107–116. [https://doi-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S1677-04202012000200004)
 1467 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S1677-04202012000200004](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S1677-04202012000200004)
- 1468 Rio, D.D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. (2005). **A review of recent studies on**
 1469 **malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative**
 1470 **stress.** *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 15, Issue
 1471 4, Pages 316-328, ISSN 0939-4753,
 1472 <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>.
- 1473 Roussos, P.A. (2023). **Adventitious Root Formation in Plants: The Implication of**
 1474 **Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide.** *Antioxidants*, 12, 862.
 1475 <https://doi.org/10.3390/antiox12040862>
- 1476 Rupp, H.-M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M., & Schmülling, T. (1999). **Increased**
 1477 **steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in**
 1478 **cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for**
 1479 **cytokinins in the shoot apical meristem.** *The Plant Journal*, 18, 557–563.
- Sharde, R., Tripathi, M.K., Bhatt, D. et al. (2024). **Influence of Plant Growth**
Regulators on In Vitro Morphogenesis in Sprout Culture of Potato
(Solanum tuberosum L.). *Potato Research*. 67, 399–420. [https://doi-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11540-023-09640-w)
[org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11540-023-09640-w](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11540-023-09640-w)

- Sharma, N., Chaudhary, C., & Khurana, P. (2022). **Transcriptome profiling of somatic embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) influenced by auxin, calcium, and brassinosteroid.** *Plant Growth Regulation*, 98(3), 599–612. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00883-0>
- Siddique, I., Anis, M., (2007). **High-frequency shoot regeneration and plantlet formation in *Cassia angustifolia* (Vahl.) using thidiazuron.** *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1:282–284
- Siddique, I., Anis, M., Jahan, A.A., (2006). **Rapid multiplication of *Nyctanthes arbor-tristis* L. by axillary shoot proliferation *in vitro*.** *World Journal of Agricultural Sciences*, 2:188–192
- Sousa, B. C., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2017). **Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds.** *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 294-308.
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2018). **Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants.** *New Phytologist, Tansley review*. Open Access. First published: 17 September 2018. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
- Sun, L. R., Zhao, Z. J., & Hao, F. S. (2019). **NADPH oxidases, essential players of hormone signalings in plant development and response to stresses.** *Plant Signaling & Behavior*, 14(11). <https://doi.org/ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1080/15592324.2019.1657343>
- Tafazoli, M., Nasr, SMH, Jalilvand, H., & Bayat, D. (2013). **Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.).** *African Journal of Biotechnology*, 12 (51), 7063-7069.
- Tang, J., Luo, X., Zhu, Y., Cai, N., Chen, L., Chen, S., Xu, Y.; (2024). ***In vitro* regeneration of triploid from mature endosperm culture of *Passiflora edulis* “Mantianxing”.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 88, Issue 4, April, Pages 412–419, <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae009>
- Varshney, A., Anis, M., (2012). **Enhancement of *in vitro* shoot morphogenesis and evaluation of changes in antioxidant enzyme activity during acclimation of micropropagated Desert Teak plants.** *Acta Physiology Plant* 34 , 859–867. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0883-9>
- Wang, P., Liu, W., Han, C., Wang, S., Bai, M., Song, C. (2023). **Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development.** *Invited expert reviews for plant research progress*. Volume

1494 66, Issue 3, Pages 330-367. [https://doi-](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jipb.13601)
 1495 [org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jipb.13601](https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jipb.13601)

Wasternack, C. and Hause, B., (2013). **Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development.** *Annals of Botany*, vol. 111, pp. 1021–1058.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). **Regulation of plant growth by cytokinin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10487-10492.

Zhang, S., Cai, Z., Wang, X., (2009) **The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 106:4543–4548

1496