

**BRUNO ÉRIC SIQUEIRA ALBINO**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CALOGÊNESE EM EXPLANTES  
RADICULARES DE *Passiflora morifolia* MASTERS, MORFOANATOMIA,  
EXPRESSÃO DO GENE *SERK*, FITOQUÍMICA E ANÁLISE DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE**

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

**VIÇOSA**

**MINAS GERAIS – BRASIL**

**2013**

**BRUNO ÉRIC SIQUEIRA ALBINO**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CALOGÊNESE EM EXPLANTES  
RADICULARES DE *Passiflora morifolia* MASTERS, MORFOANATOMIA,  
EXPRESSÃO DO GENE *SERK*, FITOQUÍMICA E ANÁLISE DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE**

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

APROVADA: 13 de março de 2013

---

Ana Cláudia Ferreira da Cruz

---

Andréa Dias Koehler

---

Cláudia Gontijo Silva

---

João Paulo Viana Leite

---

Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

*Aos meus pais,*

*Mauro José Albino, Maria Rita de Siqueira Albino,*

*Ao meu orientador e amigo,*

*Wagner Campos Otoni*

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

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

À Dra Cláudia Gontijo Silva, da Fundação Ezequiel Dias - BH, pela disponibilidade em me ajudar nos trabalhos de fitoquímica, pelos conselhos, pelo carinho, orientações, pela amizade sincera e todo zelo.

Ao pesquisador Cleber Witt Saldanha, pela ajuda nos experimentos.

À Ana Cláudia, pelo auxílio nas análises de Anatomia Vegetal.

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

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

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

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

Ao Núcleo de Microscopia e Micronálise do Centro de Ciências Biológicas da UFV, onde foram feitas as análises de microscopia de varredura.

À minha família, pelo apoio durante a realização do mestrado.

Ao meu estagiário Nathan, pela ajuda e dedicação.

Aos meus companheiros (as) do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), por sempre tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso, descontraído e alegre.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela amizade adquirida.

À minha namorada Regiane, pelo apoio, compreensão e carinho durante a realização do mestrado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação profissional e intelectual durante o mestrado.

Enfim, a Deus que está no céu sempre olhando por nós aqui na terra.

**MUITO OBRIGADO!**

## **BIOGRAFIA**

Bruno Éric Siqueira Albino, filho de Mauro José Albino e Maria Rita de Siqueira Albino, nasceu em Maria da Fé, Minas Gerais, em 4 de fevereiro de 1988.

Cursou o ensino médio na Escola Estadual Nossa Senhora de Lourdes e no Colégio 1º de Junho, em Maria da Fé, concluindo-o em 2006.

Ingressou na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) em março de 2007, onde concluiu o curso de Bacharel em Biotecnologia em dezembro de 2010.

Em 2011 iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo o curso com a defesa da dissertação no dia 13 de março de 2013.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7

### CAPÍTULO 1

#### Embriogênese somática em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters caracterização morfoanatômica e análise da expressão do gene *SERK*

INTRODUÇÃO .....	15
MATERIAL E MÉTODOS .....	18
Desinfestação e germinação in vitro .....	18
Embriogênese somática em raízes de <i>P. morifolia</i> .....	18
Análise histoquímica, anatômica e estrutural .....	19
Análise da expressão do gene <i>SERK</i> em calos embriogênicos de <i>P. morifolia</i> por hibridização in situ .....	20
Coleta e preparo dos tecidos.....	20
Síntese da sonda marcada com digoxigenina.....	21
Reação de hibridização.....	21
Delineamento Experimental .....	22
RESULTADOS .....	23
DISCUSSÃO .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

### CAPÍTULO 2

#### Calogênese em explantes radiculares, prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante em *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae)

INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
Desinfestação e germinação in vitro .....	40
Obtenção e secagem do material vegetal de <i>P. morifolia</i> .....	40
Indução de calos em raízes de <i>P. morifolia</i> .....	41
Determinação da curva de crescimento dos calos de <i>P. morifolia</i> .....	42
Exposição dos calos de raízes a diferentes tratamentos utilizando luz UV-B .....	42

Delineamento experimental .....	43
Obtenção dos extratos de <i>P. morifolia</i> .....	43
Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD).....	44
Avaliação da presença de flavonoides C-glicosilados em extratos de <i>P. morifolia</i> por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	46
Avaliação da atividade antioxidante com DPPH <sup>•</sup> em folhas, caules, raízes e calos de raízes de <i>P. morifolia</i> .....	47
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
Indução de calos em raízes de <i>P. morifolia</i> .....	48
Rendimento em extrativos .....	49
Prospecção fitoquímica.....	50
Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (CLAE-FR).....	54
Ensaio da atividade antioxidante com DPPH <sup>•</sup> .....	60
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>75</b>

## RESUMO

**ALBINO, Bruno Éric Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters, morfoanatomia, expressão do gene *SERK*, fitoquímica e análise da atividade antioxidante.** Orientador: Wagner Campos Otoni.

O objetivo geral do trabalho foi determinar um protocolo de embriogênese somática e de calogênese em raízes de *Passiflora morifolia* Masters, e realizar análises fitoquímicas em calos e em diferentes órgãos da espécie. Explantes radiculares foram incubados em meio Murashige & Skoog (MS) suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Avaliaram-se o número de explantes com formação de zonas embriogênicas e de calos, aspectos anatômicos, estruturais e moleculares, assim como, a caracterização fitoquímica de calos, de diferentes órgãos de vitroplantas e de plantas cultivadas em casa de vegetação. O primeiro capítulo teve como objetivos estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática em raízes de *P. morifolia*, e realizar a caracterização morfoanatômica do processo e de expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ*. As concentrações de 2,4-D iguais ou superiores a 6,78  $\mu\text{M}$  induziram embriogênese somática. O teste de dupla coloração com carmin acético e azul de Evans confirmou a natureza embriogênica do material. O contínuo desenvolvimento de zonas de proliferação formadas a partir do periciclo e de tecidos vasculares associados promoveu o rompimento do córtex e da epiderme da raiz, culminando na diferenciação de embriões somáticos. Adicionalmente, a hibridização *in situ* com sonda heteróloga de *PcSERK* (*Passiflora cincinnata* *SERK*), confirmou a embriogênese somática. O segundo capítulo teve como objetivos estabelecer um protocolo de calogênese em explantes radiculares de *P. morifolia*, e realizar análises fitoquímicas em calos submetidos a tratamentos com luz UV-B, e em diferentes órgãos da espécie cultivada em casa de vegetação e *in vitro* sob iluminação fornecida por lâmpadas de LED. Por cromatografia em camada delgada foram observadas diferenças fitoquímicas entre plantas e vitroplantas. Flavonoides foram facilmente observados em folhas de plantas em ambas as condições de cultivo, exceto em calos. Por cromatografia líquida de alta eficiência foi identificado isovitexina como o flavonoide presente em maior concentração nas folhas e caules de plantas cultivadas em casa de vegetação. Outros flavonoides foram identificados nos demais órgãos em ambas as condições de cultivo, com exceção dos calos. Diferenças entre a atividade antioxidante de plantas e vitroplantas foram verificadas, ao contrário do observado para os calos submetidos ao

tratamento com UV-B, quando comparados com o tratamento controle. O presente estudo demonstrou a versatilidade de raízes de *P. morifolia* para a calogênese e embriogênese, e a possibilidade de produção de metabólitos secundários em vitroplantas cultivadas sob iluminação de lâmpadas de LED.

## ABSTRACT

ALBINO, Bruno Éric Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Somatic embryogenesis and callogenesis in root explants of *Passiflora morifolia* Masters, morphoanatomy, *SERK* gene expression, phytochemistry and analysis of antioxidant activity.** Adviser: Wagner Campos Otoni.

The general objective of the study was to establish a protocol for somatic embryogenesis and callogenesis in roots of *Passiflora morifolia* Masters and carry out phytochemical analysis in root-derived calluses and in different plant organs. Root explants were plated on Murashige and Skoog (MS) supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). It was evaluated the number of explants forming embryogenic areas and calluses, anatomical, molecular and structural aspects, as well as the phytochemical characterization of calluses from different organs of in vitro plants and plants grown in the greenhouse. Chapter 1 aimed to establish a protocol for induction of somatic embryogenesis in roots of *P. morifolia* and its morphoanatomical characterization as well as of the *SERK* gene expression through in situ hybridization. Concentrations of 2,4-D greater than or equal to 6.78  $\mu\text{M}$  induced somatic embryogenesis. The double staining test with carmine acid and Evans blue confirmed the embryogenic nature of the material. The continuous development of proliferation zones from the pericycle and associated vascular tissue caused the epidermis and cortex of the root to break, leading to the differentiation of somatic embryos. Additionally, the in situ hybridization with the heterologous probe *PcSERK* (*Passiflora cincinnata SERK*) confirmed the occurrence of somatic embryogenesis. Chapter 2 aimed to establish a protocol for callus formation in root explants of *P. morifolia*, perform phytochemical analysis in callus undergoing treatment with UV-B light and perform phytochemical analysis in different organs of greenhouse-grown and in vitro-grown plants under LED illumination. Phytochemical differences between greenhouse plants and in vitro plants were detected by thin layer chromatography. Flavonoids were easily observed in leaves of plants in both culture conditions, except calluses. High performance liquid chromatography identified isovitexin as the flavonoid present with greater intensity in leaves and stems of greenhouse-grown plants. Other flavonoids were identified in other organs of plants under both culture conditions, with the exception of calluses. Differences in the antioxidant activity between greenhouse plants and in vitro plants were detected, contrary to that found for calluses treated with UV-B when compared with the control. The present study showed the versatility of *P.*

*morifolia* roots for callus formation and embryogenesis and the possibility of secondary metabolite production in in vitro plants grown under LED illumination.

## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* compreende 24 subgêneros com cerca de 520 espécies distribuídas nas regiões tropicais, destacando-se na família Passifloraceae devido a sua importância econômica (Garcia et al., 2011; Yockteng et al., 2011; Pacheco et al., 2012) e medicinal (Moreira et al., 2012). O Brasil é o centro de diversidade da família, com mais de 150 espécies nativas (Pinto et al., 2010), sendo o maior produtor mundial de maracujá, colhendo em 2009 um total de 713 mil toneladas do fruto (Meletti, 2011). Os estados da Bahia, São Paulo, Sergipe, Espírito Santo, Pará, Ceará e Minas Gerais, representam 80% da produção nacional (Roncatto et al., 2011), alicerçada somente em duas espécies, *P. edulis* Sims, o maracujá amarelo, e *Passiflora alata* Curtis, o maracujá doce (Pinto et al., 2010).

A espécie *Passiflora morifolia* Masters (subgênero *Decaloba*) ocorre naturalmente na Guatemala, México, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Brasil, Equador, Peru, Paraguai e Argentina. No Brasil é encontrada nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004; Mondin et al., 2011). *P. morifolia* possui grande potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro, pois além de resistência a bacteriose e antracnose, apresenta autocompatibilidade com outras Passifloráceas, sendo essa característica importante para aumentar a produtividade de cultivos comerciais e reduzir custos com mão de obra para polinização manual nas técnicas de melhoramento (Junqueira et al., 2005).

*P. morifolia* apresenta flores brancas, de tamanho médio, com corola de coloração arroxeadada e porte intermediário. A espécie pode ser cultivada sob baixa irradiância, favorecendo seu plantio em vasos para a ornamentação de interiores (Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004; Pires et al., 2011, Pires et al., 2012). De maneira geral, o gênero *Passiflora* apresenta imenso potencial ornamental (Peixoto, 2005). O comércio de flores de maracujá pode ser uma fonte alternativa na geração de renda para a agricultura familiar, otimizando o uso de recursos naturais (Abreu et al., 2009).

O maracujazeiro é uma cultura bem estudada *in vitro*, não se mostrando recalcitrante e respondendo bem à aplicação de reguladores de crescimento, já tendo sido possível completar o ciclo de micropropagação (Grattapaglia et al., 1991;

Apezzato-da-Glória et al., 2005). No entanto, ressalta-se que o potencial propagativo do gênero *Passiflora* depende da espécie e da fonte de explantes utilizada (Apezzato-da-Glória et al., 1999).

Existem duas vias morfogênicas in vitro: a embriogênese somática e a organogênese. A embriogênese somática é caracterizada pela formação de uma estrutura bipolar, no qual seus domínios (meristemas apicais caulinares e radiculares) são formados num único eixo e temporalmente sincronizados (Rocha, 2011). Na organogênese in vitro, o desenvolvimento de espécies vegetais ocorre em dois estádios, uma vez que a organização dos domínios apicais apresenta uma separação temporal. A organogênese é a via predominante em sistemas de regeneração in vitro de maracujá (Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012b; Otoni et al., 2013). Embora, protocolos otimizados de embriogênese somática permitem obter melhores taxas de regeneração e nível limitado de variação somaclonal (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010).

O desenvolvimento de protocolos de regeneração via embriogênese somática pode facilitar o entendimento das modificações celulares que ocorrem durante a diferenciação embriogênica de tecidos específicos (Rocha et al., 2012a), assim como servir de base para a caracterização da expressão gênica, a exemplo do gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)*, durante o processo morfogênico in vitro (Suprasanna et al., 2013). No entanto, a baixa frequência de regeneração continua a impedir a efetiva propagação do gênero *Passiflora* via embriogênese somática (Zerbini et al., 2008), sendo necessário testar e estender os protocolos existentes a outros membros da família Passifloraceae (Otoni et al., 2013).

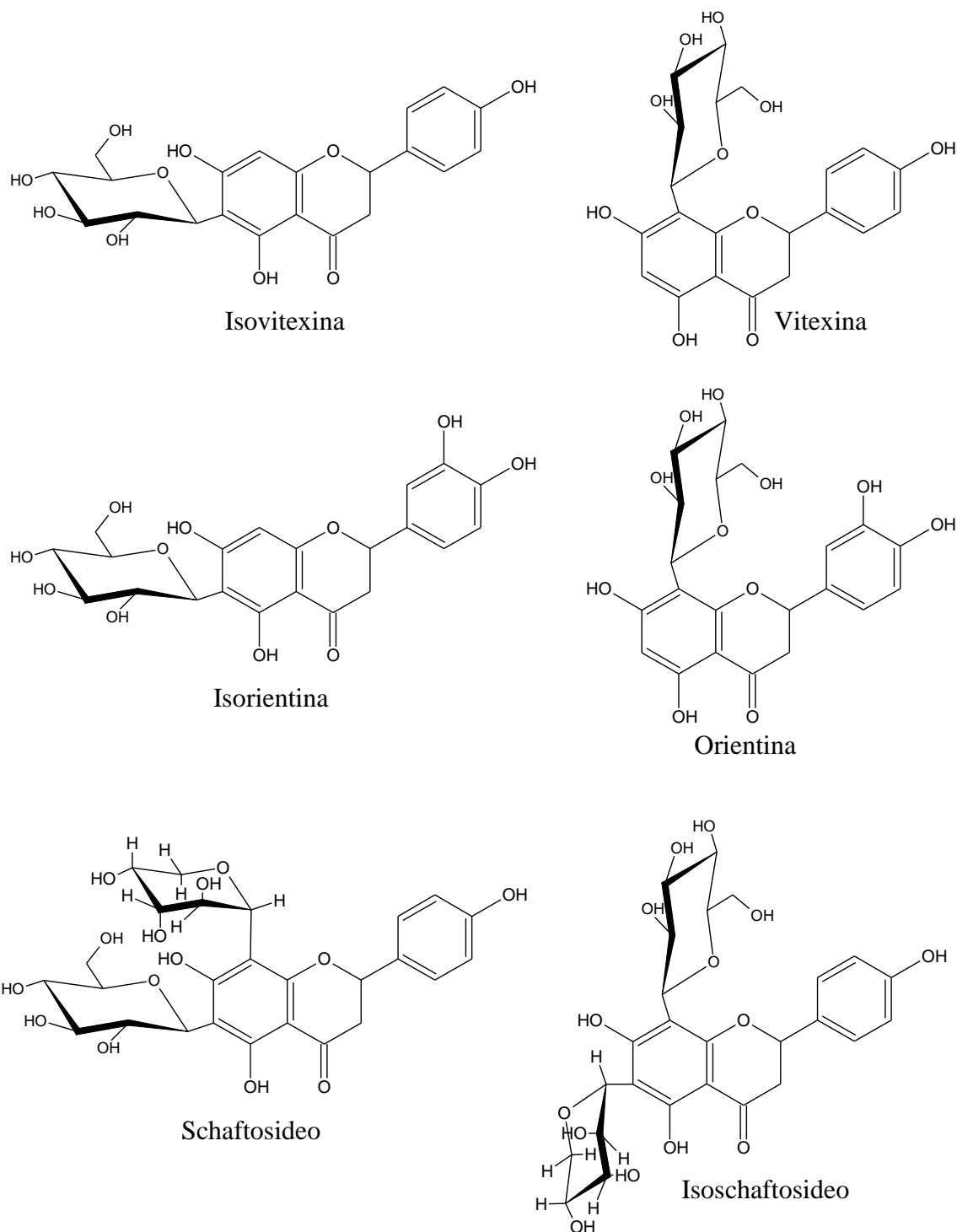
Na literatura são poucos os relatos de embriogênese somática em maracujá. Os trabalhos existentes restringem-se a cultura de suspensões celulares embriogênicas de *P. giberti* (Otoni, 1995; Anthony et al., 1999), embriogênese a partir de cultura de raízes de *P. cincinnata* transformadas geneticamente com *Agrobacterium rhizogenes* (Reis et al., 2007), embriogênese a partir de embriões zigóticos em *P. cincinnata* (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012a) e *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011). Para *P. morifolia*, espécie objeto do presente estudo, a cultura de embriões zigóticos em meio contendo cinetina, ácido naftalenoacético e ácido giberélico promoveu a germinação e calejamento (Guzzo et al., 2004), sendo o único relato de cultura de tecidos encontrado para a espécie.

Na literatura são encontrados vários trabalhos de regeneração de *Passiflora* spp. via organogênese utilizando diferentes fontes de explantes, como por exemplo, folhas,

cotilédones, hipocótilos, segmentos do entrenó e de raízes (Apezzato-da-Glória et al., 2005). Devido à fácil manutenção e manipulação *in vitro* de explantes radiculares (Vinocur et al., 2000), estes podem ser um excelente modelo para estudos dos processos morfológicos, fisiológicos, anatômicos e moleculares envolvidos durante o processo embriogênico. Explantes radiculares de *Passiflora* têm mostrado grande potencial organogênico quando comparados a outros explantes não meristemáticos (Lombardi et al., 2007; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012b). Raízes também podem ser vantajosas para estudos envolvendo transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Reis et al., 2007). Além disso, este tipo de explante tem recebido atenção considerável devido ao seu potencial na produção de metabólitos secundários podendo ser utilizados em estudos de farmacologia e fitoquímica (Zobayed & Saxena, 2003; Simões et al., 2009; Thwe et al., 2012).

Diversas espécies de *Passiflora* apresentam propriedades farmacológicas importantes e são utilizadas na medicina tradicional de vários países como sedativas e tranquilizantes (Patel et al., 2011; Gosmann et al., 2011; Moreira et al., 2012). O Brasil agrega porção significativa da diversidade genética de maracujás com uso medicinal (Costa & Tupinambá, 2005). As espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata* são as mais utilizadas em preparações fitoterápicas sendo que, as duas últimas, são drogas oficiais da quinta edição da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010).

Alguns dos principais constituintes químicos das espécies de *Passiflora* são alcaloides, fenóis, compostos cianogênicos, esteróis, lignanos e flavonoides (Costa & Tupinambá, 2005). Os flavonoides do tipo C-glicosídeo, dentre esses, vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, schaftosídeo e isoschaftosídeo (Fig. 1), são a classe mais citada na literatura (Pereira & Vilegas, 2000; Dhawan et al., 2004; Gosmann et al., 2011). A presença desses flavonoides C-glicosilados derivados da apigenina e luteolina tem sido relatada nas folhas e no pericarpo dos frutos de *Passiflora* spp. (Zucolotto et al., 2011; Moreira et al., 2012), assim como em partes aéreas de *P. morifolia* (Avula et al., 2012).



**Figura 1** - Estrutura química dos principais flavonoides C-glicosídeos encontrados em espécies de *Passiflora*.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais amplamente distribuídos no reino vegetal (Zuanazzi & Montanha, 2004). Atuam na defesa contra ataque de patógenos e herbívoros, na proteção contra a radiação ultravioleta e visível, na

atração de polinizadores, na sinalização para relações simbióticas e no controle da ação de hormônios vegetais (Zuanazzi & Montanha, 2004; Parr & Bolwell, 2000; Petkovsek et al., 2011). Dependendo da estrutura química apresentam diversas atividades farmacológicas importantes (Filho et al., 2001; Zuanazzi & Montanha, 2004). Como antioxidantes estão associados à prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios relacionados ao envelhecimento, entre outros (Commenges et al., 2000; Justesen et al., 2000).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos flavonoides têm atraído a atenção dos cientistas devido à possibilidade de produção, em grande escala, sob condições controladas (Antognoni et al., 2007; Sabir et al., 2012). A cultura de tecidos vegetais representa uma fonte potencial para a produção de valiosos metabólitos secundários que podem ser usados como aditivos alimentares, nutracêuticos e fármacos (Smetanska, 2008). A produção *in vitro* de metabólitos secundários em cultura de suspensões celulares e calos tem sido relatada para várias plantas medicinais (Hussain et al., 2012), sendo que, em muitos casos, o isolamento e purificação a partir da planta e sua síntese química não são possíveis ou viáveis economicamente (Smetanska, 2008).

Na cultura de calos provenientes de explantes foliares de *P. alata*, independente da adição ao meio de cultura do aminoácido *L*-triptofano, precursor dos alcaloides  $\beta$ -carbonílicos, não houve produção desses metabólitos (Machado et al., 2010). No entanto, em calos obtidos a partir de explantes foliares de *P. quadrangularis*, o tratamento com luz ultravioleta (UV-B) promoveu aumento na produção dos flavonoides orientina, isovitexina e vitexina (Antognoni et al., 2007). Assim, o estímulo do metabolismo secundário, mediante o tratamento *in vitro* com agentes estressores, vem sendo uma estratégia interessante para a otimização da produção de tais compostos secundários (Rodrigues & Almeida, 2010; Rezaei et al., 2011).

Dada a importância do entendimento dos mecanismos envolvidos na indução de competência celular à embriogênese, análises histológicas, ultra-estruturais e de expressão gênica do processo morfogênico *in vitro* tornam-se necessárias para a melhor compreensão, otimização e validação do seu uso em protocolos de transformação genética. Por outro lado, considerando o potencial de *P. morifolia* para a produção de metabólitos secundários, há a necessidade de estudar a produção *in vitro* destes compostos em diferentes órgãos e em calos da espécie, visto não haver trabalhos desta natureza relatados na literatura até o momento.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo determinar um protocolo de embriogênese somática em raízes de *P. morifolia* e avaliar em condições de casa de vegetação e in vitro, o potencial da espécie para a produção de metabólitos secundários. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar a influência do 2,4-D na indução de embriogênese somática em raízes de *P. morifolia*, utilizando de análises histológicas, ultra-estruturais e de expressão do gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* para a caracterização desse processo morfogênico. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar a influência do 2,4-D na indução calos em explantes radiculares de *P. morifolia*, realizando também análises fitoquímicas para identificar os metabólitos secundários em calos submetidos a tratamentos com luz UV-B e em diferentes órgãos da espécie, cultivada em casa de vegetação e in vitro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu PP, Souza MM, Santos EA, Pires MV, Pires MM, Almeida AAF (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica* 166: 307-315.

Anthony P, Otoni WC, Power JB, Lowe KC, Davey MR (1999) Protoplasts isolation, culture and plant regeneration from *Passiflora*. In: Hall RD (ed) Methods in molecular biology, plant cell culture protocols. Totowa: Humana Press Inc. pp 169-181.

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

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

Appezato-da-Glória B, Vieira MLC, Dornelas MC (1999) Anatomical studies of in vitro morphogenesis in leaf explants of passion fruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 2007-2013.

Appezato-da-Glória B, Fernando JA, Machado SR, Vieira MLC (2005) Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro de maracujazeiro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 387-407.

Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal Epidemiology* 16: 357-63.

Costa AM, Tupinambá DD (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 475-506.

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

Filho DW, Silva EL, Boveris A (2001) Flavonoides oxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes RA, Calixto JB (eds) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos. pp 317-334.

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

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

Grattapaglia D, Caldas LS, Silva JR, Machado MA (1991) Cultura de tecidos do Maracujá. In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (eds) *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal: FUNEP. pp 61-77.

Guzzo F, Ceoldo S, Andretta F, Levi M (2004) In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola* 61: 108-113.

Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ, Saeed M (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 4: 10-20.

Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 81-108.

Justesen U, Knuthsen P, Andersen NL, Leth T (2000) Estimation of daily intake distribution of flavonols and flavanones in Denmark. *Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning* 144: 158-160.

- Lombardi SP, Passos IRDS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 239-247.
- Machado MW, Neto CS, Salgado J, Zaffari G, Barison A, Campos FR, Corilo YE, Eberlin MN, Biavatti MW (2010) Search for alkaloids on callus culture of *Passiflora alata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 901-910.
- Meletti LMM (2011) Avanços na cultura de maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* Volume Especial: 83-91.
- Milward-de-Azevedo MA, Baumgratz JFA (2004) *Passiflora* L. Subgênero *Decaloba* (Dc.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia* 55: 17-54.
- Mondin CA, Cervi AC, Moreira GRP (2011) Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 3-27.
- Moreira CPS, Silva CG, Almeida VL (2012) Propriedades químicas e medicinais do maracujá. *Informe Agropecuário* 33: 7-16.
- Otoni WC (1995) Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 198p.
- Otoni WC, Paim Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LC, Tanaka FAO (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) Somatic embryogenesis and gene expression. New Delhi: Narosa Publishing House. pp 1-17.
- Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae* 144: 42-47.
- Paim Pinto DL, Almeida Barros B, Viccini LF, Campos JMS, Silva MLD, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 71-79.

- Paim Pinto DL, Almeida AMR, Rêgo MM, Silva ML, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 521-530.
- Parr AJ, Bolwell GP (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985-1012.
- Patel S, Soni H, Mishra K, Singhai AK (2011) Recent updates on the genus *Passiflora*: a review. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* 1: 1-16.
- Peixoto M (2005) Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 457-463.
- Pereira CAM, Vilegas JHY (2000) Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase em *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3: 1-12.
- Petkovsek MM, Slatnar A, Stampar F, Veberic R (2011) Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia Plantarum* 55: 725-730.
- Pinto APC, Monteiro-Hara ACBA, Stipp LCL, Mendes BMJ (2010) In vitro organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 46: 28-33.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2011) Photosynthetic characteristics of ornamental passion flowers grown under different light intensities. *Photosynthetica* 49: 593-602.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2012) Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. *Acta Scientiarum* 34: 67-75.
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim Pinto DL, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738: 425-431.

- Rezaei A, Ghanati F, Behmanesh M, Ari-dizaji MM (2011) Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in Medicine & Biology* 37: 1938-1947.
- Rocha DI (2011) Estudos anatômicos e ultra-estruturais de sistemas de regeneração in vitro de *Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 48p.
- Rocha D, Vieira L, Tanaka F, Silva LC, Otoni W (2012a) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249: 747-758.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LCD, Otoni WC (2012b) Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 69-78.
- Rodrigues FR, Almeida WAB (2010) Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos in vitro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12: 333-340.
- Roncatto G, Assis GML, Oliveira TK, Lessa LS (2011) Pegamento da enxertia em diferentes combinações de variedades e espécies utilizadas como copa e como porta-enxertos de maracujazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 948-953.
- Sabir SM, Ahmad SD, Hamid A, Khan MQ, Athayde ML, Santos DB, Boligon AA, Rocha JBT (2012) Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chemistry* 131: 741-747.
- Silva ML, Paim Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 47-54.
- Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LC, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 407-416.

Simões C, Albarello N, Callado CH, Castro TC, Mansur E (2009) New approaches for shoot production and establishment of in vitro root cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 90: 79-86.

Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: Stahl U, Donalies UB, Nevoigt E (eds) Food Biotechnology. Heidelberg: Springer. pp 187-228.

Suprasanna P, Sidha M (2013) Somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) Somatic embryogenesis and gene expression. New Delhi: Narosa Publishing House. pp 188-200.

Thwe AA, Mai NTT, Li X, Kim Y, Kim YB, Uddin MR, Kim YS, Bae H, Kim HH, Lee MY, Park SU (2012) Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Plant Omics Journal* 5: 466-470.

Vinocur B, Carmi T, Altman A, Ziv M (2000) Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) root cultured in liquid media. *Plant Cell Reports* 19: 1146-1154.

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

Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Passion fruit. In: Kole C, Hall TC (eds) A compendium of transgenic crop plants - tropical and subtropical fruit and nuts. Berlin: Wiley. pp 213-234.

Zobayed SMA, Saxena PK (2003) In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv "New Stem") in a temporary immersion bioreactor. *Plant Science* 165: 463-470.

Zuanazzi JAS, Montanha JA (2004) Flavonoides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (eds) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS. pp 576-614.

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP (2011) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* 23: 232-239.

## **CAPÍTULO 1**

**Embriogênese somática em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters  
caracterização morfoanatômica e análise da expressão do gene *SERK***

## INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) compreende 24 subgêneros e 520 espécies distribuídas nas regiões subtropicais (Garcia et al., 2011; Yockteng et al., 2011; Pacheco et al., 2012). *P. morifolia* destaca-se entre as espécies de maracujá, devido à possibilidade de sua utilização em programas de melhoramento genético, possuindo potencial ornamental e resistência a doenças como bacteriose e antracnose (Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004; Junqueira et al., 2005; Pires et al., 2011; Pires et al., 2012). *P. morifolia* também tem recebido a atenção dos pesquisadores devido à produção de flavonoides e de glicosídeos cianogênicos, que apresentam importantes atividades farmacológicas (Jaroszewski et al., 1996; Avula et al., 2012).

Os estudos em cultura de tecidos de *Passiflora* foram iniciados por Nakayama (1966). Via de regra, as espécies de maracujá não se mostram recalcitrantes para a morfogênese in vitro, respondendo bem à aplicação de reguladores de crescimento. No entanto, as culturas in vitro dessas espécies têm apresentado problemas, tais como, clorose, contaminação microbiana, oxidação fenólica, sensibilidade a baixas trocas gasosas e produção de etileno. Tais problemas justificam a necessidade da realização de mais pesquisas, buscando o desenvolvimento de novos protocolos de regeneração in vitro para *Passiflora* spp. (Garcia et al., 2011; Otoni et al., 2013). Trabalhos envolvendo a cultura de tecidos de *P. morifolia* não são frequentes, restringindo-se apenas ao estudo realizado por Guzzo et al. (2004) no cultivo in vitro de sementes maduras.

Dentre as vias morfogênicas, as organogêneses axilar e adventícia têm sido as mais amplamente relatadas para espécies do gênero, porém há perspectivas de que os relatos de embriogênese somática se ampliem para Passifloráceas (Otoni et al., 2013). O primeiro relato de embriogênese somática no gênero aconteceu na década de 90 para *Passiflora giberti* N. E. Brown (Otoni, 1995), seguido por outros em *P. cincinnata* Mast. (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012a) e em *P. edulis* Deg. (Paim Pinto et al., 2011). A embriogênese somática é o processo pelo qual uma única célula ou pequeno grupo de células somáticas, incluindo células haploides, a partir da percepção de sinais específicos, adquirem a competência para dividir-se e formar estruturas bipolares, que passam por estádios embriogênicos subsequentes característicos, podendo originar uma planta (Fehér et al., 2003; Fehér, 2005; Yang et al., 2010; Rose et al., 2010). Essa via morfogênica possui um papel de destaque entre as

técnicas de cultura de tecidos, podendo ser utilizada para a propagação de espécies de alto valor econômico, possibilitando a geração de plantas geneticamente uniformes e livres de doenças (Tonietto et al., 2012), além de servir como modelo para compreensão dos aspectos morfofisiológicos e moleculares envolvidos na diferenciação celular (Fehér et al., 2003; Rocha et al., 2012a). As raízes como fonte de explantes para a regeneração *in vitro*, têm sido consideradas um excelente modelo para estudos fisiológicos, anatômicos e moleculares (Atta et al., 2009). Porém, até o momento, não há relatos do potencial de explantes radiculares na indução de embriogênese somática em *Passiflora morifolia*.

A caracterização das mudanças celulares que ocorrem durante a embriogênese somática é essencial para o entendimento dos fatores envolvidos na transição de células somáticas em células competentes embriogênicas e determinação das células e/ou tecidos envolvidos (Rocha et al., 2012a). Em *Passiflora* spp. estudos anatômicos e ultra-estruturais têm fornecido descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e histodiferenciação de embriões somáticos (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012a). Contudo, devido à quase inexistência de protocolos de indução de embriogênese somática em explantes radiculares de *Passiflora*, estudos dessa natureza foram realizados apenas na organogênese *in vitro* (Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012b).

Em adição aos estudos morfoanatômicos, o conhecimento dos fatores genéticos que controlam a embriogênese somática ainda é incipiente, comprovando que existem muitos pontos a serem entendidos sobre o processo. Durante a fase de indução dos embriões somáticos, ocorre a expressão de genes específicos relacionados aos diferentes estádios do desenvolvimento embrionário (Schlögl et al., 2012; Steiner et al., 2012). Um dos primeiros genes a ser expresso durante a embriogênese zigótica ou somática faz parte da família gênica S*SOMATIC* E*MBRYOGENESIS* R*ECEPTOR-LIKE* K*KINASE* (*SERK*) (Schmidt et al., 1997). Os genes *SERK* codificam para um subgrupo de receptores transmembranas com repetições ricas em leucina, que possuem um domínio quinase intracelular, e estão envolvidos em processos-chave do desenvolvimento das plantas (Steiner et al., 2012).

A visualização do padrão de expressão de um gene pode fornecer informações importantes sobre sua função, além de servir como um marcador de diferenciação celular ou do estímulo fisiológico recebido pelas células (Wilkinson et al., 1995). A expressão de genes pertencentes à família *SERK* pode ser usada como um marcador da

embriogênese somática ou de células competentes para formar embriões somáticos (Steiner et al., 2012; Ma et al., 2012). Recentemente, genes desta família foram apontados como marcadores da pluripotência, estando presentes tanto no programa embriogênico quanto organogênico (Savona et al., 2012). A expressão de genes *SERK* em sistemas embriogênicos ou organogênicos, vem sendo associada à aplicação de auxinas combinadas ou não com citocininas (Nolan et al., 2003; Beveridge et al., 2007; Wang et al., 2011; Ma et al., 2012). Portanto, a expressão desses genes é muito influenciada pelos componentes do meio de cultivo, podendo servir de marcador da embriogênese somática em *Passiflora* spp.

O estudo da expressão gênica na embriogênese somática em raízes de *P. morifolia* submetidas a diferentes concentrações de 2,4-D, é uma abordagem ainda inexistente para o gênero. Desta maneira, o desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática em explantes radiculares de *P. morifolia*, além de auxiliar na propagação da espécie, ajudaria no entendimento das bases genéticas da embriogênese somática em raízes de maracujá, permitindo futuras aplicações em técnicas de transformação genética e de melhorias no protocolo de propagação.

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática em raízes de *P. morifolia*, sendo realizado um estudo de caracterização morfoanatômica do processo e de avaliação do padrão de expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desinfestação e germinação *in vitro*

Foram utilizadas sementes maduras colhidas de frutos, pertencentes a plantas de *P. morifolia* com um ano de idade, crescidas em vasos de 10 L de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças, Vida Verde, Brasil). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Com o auxílio de uma mini morsa, foram retirados os tegumentos das sementes segundo protocolo estabelecido por Reis et al. (2007). Sob condições assépticas, a desinfestação das sementes consistiu da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, e hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com duas gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v), durante 15 minutos. Logo após, foram feitas três lavagens com água deionizada estéril.

Cerca de dez sementes sem tegumento foram transferidas para frascos (250 mL de capacidade), vedados com tampa rígida de prolipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm de poros (Milliseal<sup>®</sup>, AVS-045 Air Vent, Japão), contendo aproximadamente 60 mL de meio de cultura composto por sais MS (Murashige & Skoog, 1962) meia força, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 1,5 % (p/v) de sacarose e 0,005% (p/v) de mio-inositol. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 e acrescido 0,25% (p/v) de agente geleificante (Phytigel<sup>®</sup>, Sigma Chemical Company, EUA), sendo o meio autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu no escuro sob temperatura de  $27 \pm 2$  °C, por um período de 15 dias. Após este tempo, os frascos foram transferidos para o ambiente iluminado da sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 2 lâmpadas de LED com 17W (Vilux<sup>®</sup>, LLTV03, Brasil).

### Embriogênese somática em raízes de *P. morifolia*

Decorridos 35 dias após a inoculação das sementes para a germinação, as raízes principais das vitroplantas foram excisadas e segmentadas em fragmentos de 8 a 10

mm. Os explantes radiculares foram inoculados em placas de Petri de poliestireno estéreis (J. Prolab, 90 x 15 mm, Brasil), vedadas com filme plástico transparente PVC (Goodyer, Brasil), contendo aproximadamente 30 mL de meio MS, complexo vitamínico B5, 3% (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol e diferentes concentrações (0; 4,52; 6,78; 9,04 e 11,3  $\mu$ M) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e acrescido 0,25% (p/v) de Phytigel, antes da autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min. A incubação das placas foi realizada no escuro, em câmara de crescimento (Forma Scientific, 3740, EUA) e sob temperatura de  $27 \pm 2$  °C.

Decorridos 90 dias após a incubação das placas, foram avaliados os efeitos dos tratamentos na indução da competência embriogênica nas raízes, considerando o número de explantes com formação de zonas embriogênicas.

### **Análise histoquímica, anatômica e estrutural**

As amostras selecionadas para as análises citológicas foram as que, por análise visual, apresentaram estruturas pro-embriogênicas. Massas pro-embriogênicas foram cortadas em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg & Bohering Comércio e Importação Ltda, Brasil) e coradas com Azul de Evans (0,5%) seguido de carmin acético (0,1%), ambos por 3 minutos (Durzan, 1998).

Para avaliar anatomicamente o processo de embriogênese in vitro foi realizada a coleta de segmentos de raízes após 90 dias de cultivo no meio de indução com 6,78  $\mu$ M de 2,4-D, sendo fixados em solução de Karnovsky modificada [2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose,  $\text{CaCl}_2$  5  $\mu$ M em tampão cacodilato 0,1 M, com pH 6,8] (Karnovsky, 1965) por 72 h, a 4 °C. Em seguida, foram desidratadas em série etílica e incluídos em resina acrílica (Historesin Leica<sup>®</sup>, Alemanha). Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (Leica, RM2155, Alemanha). Os cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram aderidos em lâminas histológicas, sendo estas coradas com Azul de Toluidina a 0,05%, pH 6,8 (O'Brien & McCully, 1981) por 10 minutos. Após a secagem as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética Permout. A captura das imagens foi realizada em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic

Instruments Inc., Spot Insightcolour 3.2.0, EUA), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Para a análise estrutural, calos embriogênicos foram fixados em solução de Karnovsky modificada, por 72 h, a 4 °C. As amostras foram desidratadas em série etílica e levadas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido (Bal-Tec, 030 CPD, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram afixadas nos “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As fotografias foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP, Inglaterra), localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### **Análise da expressão do gene *SERK* em calos embriogênicos de *P. morifolia* por hibridização *in situ***

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

Para avaliar a expressão do gene *SERK*, foram coletados calos embriogênicos de *P. morifolia* com 90 dias de cultura em meio MS contendo 6,78 µM de 2,4-D. As amostras foram coletadas em condições livres da ação de RNAses e imersas imediatamente em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,25% em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2. As amostras foram submetidas a vácuo por 1 h à temperatura ambiente. A solução fixadora foi renovada e mantida a 4 °C ‘overnight’. Em seguida as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0 e desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%), por 1 h cada. Em seguida procedeu-se à infiltração das mesmas em solução de etanol: xileno, nas concentrações de 3:1, 1:1, 1:3, a cada 4 h, finalizando com xileno 100% por 8 h. As amostras foram então transferidas para a estufa a 65 °C e, gradativamente, infiltradas com parafina durante 12 h.

Secções de 10 µm foram obtidas utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (Leica, RM2255, Alemanha), sendo esticadas a 42 °C em banho-maria contendo água tratada com DEPC, e depois colocadas em lâminas livres de RNAses. As lâminas receberam um pré-tratamento com Extran<sup>®</sup> 5% (Merck, Alemanha) durante 4 h, depois foram tratadas com ácido clorídrico 10% por mais 4 h e logo após foram

enxaguadas em água corrente e secas em estufa a 65 °C. Após essa etapa as lâminas foram esterilizadas em estufa a 180 °C e passaram por tratamento com organossilano (Sigma-Aldrich, USA), consistindo das seguintes etapas: imersão em acetona durante 10 s, depois imersão em solução de organossilano 2% em acetona, durante 6 minutos e por fim, imersão em acetona durante 10 s. Depois desse processo as lâminas foram secas em estufa a 65 °C e armazenadas a 4 °C até o momento do uso. Antes da hibridização a parafina foi removida em xileno 100% (duas trocas de 5 min), xileno: etanol (1:1, v/v) por 10 minutos e etanol 100% por 10 minutos.

### **Síntese da sonda marcada com digoxigenina**

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

### **Reação de hibridização**

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

Para a hibridização *in situ*, foram utilizados 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL<sup>®</sup>) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 minutos e adicionados a 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X). Em seguida, para a hibridização, 100 µL de solução de hibridização foram colocados sobre os cortes em cada lâmina e cobertas com Parafilm<sup>®</sup>. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 16 h. Após a hibridização as lâminas foram lavadas em solução SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X composta por NaCl 3M, Na<sub>3</sub>-citrato 0,3M, pH 7,2), cada solução por 20 minutos. Em seguida foram

mantidas por 5 minutos em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 minutos em tampão de bloqueamento (BSA 2% em tampão de detecção 1). As lâminas foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 minutos e incubadas durante 1 h com anticorpo *Anti-Digoxigenine AP Fab Fragments* (Roche®) diluído 1:1000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 minutos cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 minutos em tampão de detecção 3 (0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (0,05 g mL) e 4,5 µL de NBT (nitroblue tetrazólio) (0,05 g mL) em 1 mL de tampão de detecção 3 por 45 minutos, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 minutos, e as lâminas montadas em glicerol.

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

### **Delineamento Experimental**

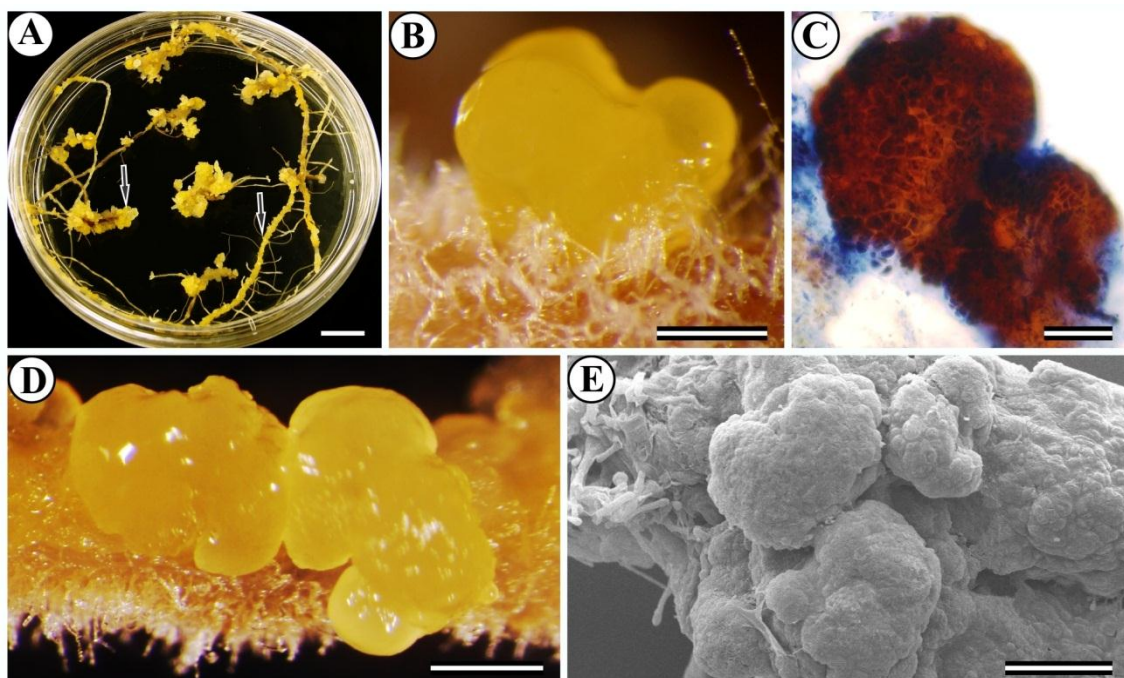
O experimento foi constituído por 5 tratamentos (0; 4,52; 6,78; 9,04 e 11,3 µM de 2,4-D) com 10 repetições, sendo a unidade experimental composta por uma placa de Petri, contendo 8 segmentos radiculares cada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010). O experimento foi repetido três vezes.

## RESULTADOS

Após 30 dias de cultivo, em todas as concentrações de 2,4-D testadas, foi observado o crescimento de raízes laterais nos explantes inoculados. Ao final de 90 dias de incubação, em todos os tratamentos, com exceção do controle, ocorreu a formação de calos no explante inicial e ao longo das raízes laterais (Fig. 1A). As concentrações de 2,4-D, maiores ou iguais a 6,78  $\mu\text{M}$ , promoveram embriogênese somática direta nas raízes. Os embriões somáticos estavam em estágio globular, possuindo coloração amarela e aspecto translúcido (Fig. 1B).

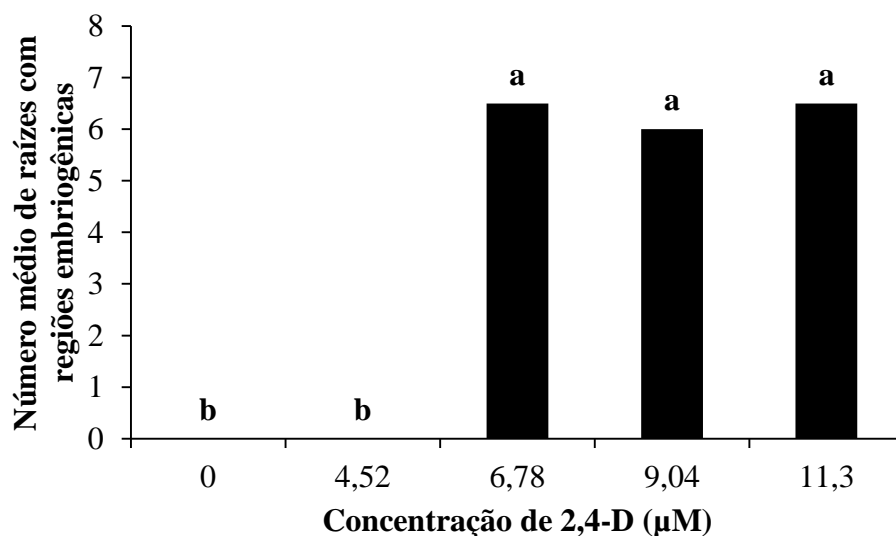
A confirmação da ocorrência de embriogênese somática foi realizada mediante o teste histoquímico de dupla coloração com carmin acético e azul de Evans. Desta maneira, setores de natureza pró-embriogênica e embriões somáticos cultivados no meio de indução foram intensamente corados de vermelho intenso (Fig. 1C).

Ao longo do explante inicial e das raízes laterais, também foi observada a presença de calos friáveis, de coloração amarela e que apresentavam massas celulares pró-embriogênicas densamente agrupadas (Fig. 1D). A análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que estes calos eram formados por protuberâncias nodulares que cobriam a superfície do explante e não apresentavam embriões somáticos em estádios característicos de desenvolvimento (Fig. 1E).



**Figura 1** - Caracterização morfológica, histoquímica e estrutural da embriogênese somática em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters. **A:** Crescimento de raízes laterais e calogênese nos explantes inoculados em meio contendo 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Barra = 1 cm). Calo embriogênico (setas). **B:** Embriogênese somática direta em meio contendo 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Barra = 200  $\mu\text{m}$ ). **C:** Embrião contendo células coradas com carmin acético (Barra = 100  $\mu\text{m}$ ). **D:** Calos embriogênicos formados ao longo de raiz lateral em meio contendo 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Barra = 1mm). **E:** Calos embriogênicos em microscopia eletrônica de varredura (Barra = 200  $\mu\text{m}$ ).

Diferenças significativas foram verificadas entre o número de raízes com formação de massas pró-embriogênicas em função das diferentes concentrações de 2,4-D. Não foi observada a formação de embriões na ausência do regulador de crescimento ou na concentração de 4,52  $\mu\text{M}$ . No entanto, em média, 80% das raízes apresentaram resposta embriogênica, nos tratamentos que continham concentração de 2,4-D igual ou superior a 6,78  $\mu\text{M}$  (Fig. 2).



**Figura 2** - Média por placa do número de raízes de *Passiflora morifolia* Masters com setores embriogênicos, após 90 dias no meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Cada placa foi inicialmente inoculada com 8 explantes radiculares.

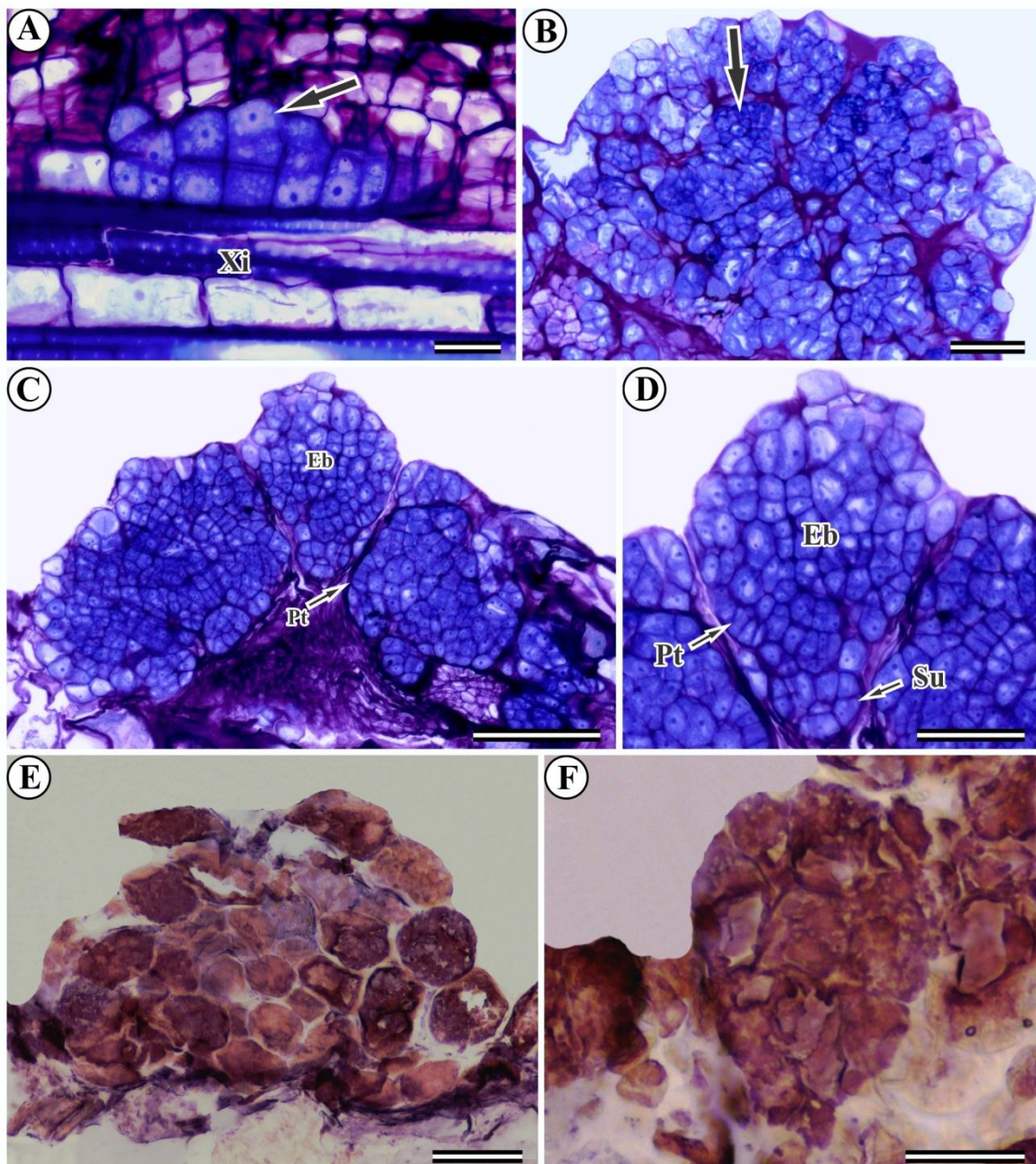
Através da análise anatômica, verificou-se que a origem histológica dos embriões e dos calos embriogênicos se dava a partir das células do periciclo e de tecidos vasculares associados (Fig. 3A). Durante o processo de celularização, as células mãe embriogênicas sofreram divisões periclinais, levando a formação de zonas de proliferação constituídas por células com características meristemáticas (Fig. 3A). Estas células foram coradas de azul, possuíam núcleo evidente, conteúdo citoplasmático denso e pequeno tamanho (Fig. 3A). Nos calos embriogênicos foi observado que as células estavam formando pequenos grupos, que não caracterizavam embriões somáticos em estádios comumente observados no desenvolvimento embriogênico (Fig. 3B).

O contínuo desenvolvimento das zonas de proliferação promoveu o rompimento do córtex e da epiderme da raiz lateral, culminando com a formação dos embriões somáticos em estágio globular (Fig. 3C). Foi observado o início da formação da protoderme nos embriões, assim como a presença de uma estrutura similar ao suspensor (Fig. 3D).

O resultado de hibridização in situ, utilizando a sonda desenvolvida para *P. cincinnata*, mostrou que nos calos embriogênicos de *P. morifolia*, ocorreu sinal de expressão do gene *SERK* (Fig. 3E), assim como em embriões somáticos em estágio

globular (Fig. 3F). Os resultados servirão de base para a continuação das pesquisas envolvendo expressão gênica durante o processo embriogênico da espécie.

Na tentativa de promover o desenvolvimento e a germinação dos embriões, os segmentos radiculares, contendo calos embriogênicos e embriões em estágio globular, foram utilizados como fonte de explantes em experimentos posteriores. No entanto, o desenvolvimento dos embriões não foi alcançado em nenhum dos testes realizados.



**Figura 3** - Caracterização histológica e expressão do gene *SERK* na embriogênese somática em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters. **A:** Seção longitudinal mostrando zonas de proliferação formadas por células com características meristemáticas (Barra = 100 µm). Divisões periclinais a partir do periciclo e de tecidos vasculares associados (seta). **B:** Corte histológico mostrando a organização celular dos calos embriogênicos (Barra = 300 µm). Grupos de células pró-embriogênicas (seta). **C:** Seção longitudinal mostrando embriões somáticos (Eb) em estágio globular (Barra = 200 µm). **D:** Seção longitudinal mostrando embriões somáticos com o início da formação de protoderme e suspensor (Barra = 100 µm). **E:** Calo embriogênico mostrando massas pró-embriogênicas com sinal de hibridização (Barra = 100 µm). **F:** Embrião somático mostrando sinal de hibridização (Barra = 25 µm). Abreviaturas: Pt, protoderme; Su, suspensor; Xi, xilema.

## DISCUSSÃO

O presente estudo relata pela primeira vez a indução de embriogênese somática direta e indireta em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters, confirmada por técnicas histológicas e de biologia molecular. Embora Reis et al. (2007) relatassem a formação esporádica e episódica de embriões somáticos em calos oriundos de raízes transformadas de *P. cincinnata*, a ocorrência de tal processo morfogênico, em raízes de outras espécies de *Passiflora*, não havia sido relatada na literatura até o momento.

O início da formação de embriões somáticos em *P. morifolia*, ocorreu em torno dos 60 dias de incubação no meio de indução contendo 2,4-D. Silva et al. (2009) e Paim Pinto et al. (2011) observaram a formação de calos embriogênicos em embriões zigóticos de *P. cincinnata* e *P. edulis*, respectivamente, em torno de 20 dias após a inoculação em meio de indução contendo diferentes combinações de 2,4-D e 6-benzilaminopurina (BA). O uso isolado ou combinado dessa auxina com outros reguladores de crescimento, principalmente citocininas, tem gerado bons resultados para várias espécies na indução de embriogênese somática via cultura de sementes e embriões zigóticos (Silva et al., 2009). No entanto, em testes preliminares realizados no presente estudo, a combinação de diferentes concentrações de 2,4-D e BA não promoveu a formação de embriões somáticos em explantes radiculares de *P. morifolia* (dados não mostrados).

Vários estudos têm mostrado que o 2,4-D induz a embriogênese somática em várias espécies de plantas. Esta auxina tem sido requerida para o início da programação celular via embriogênese somática (Fehér et al., 2003; Raghavan, 2004; Fehér, 2005; Ksia et al., 2008; Pan et al., 2010). Nos explantes radiculares de *P. morifolia*,

concentrações não muito elevadas de 2,4-D permitiram a obtenção de taxas significativas de formação de embriões somáticos. O presente resultado é importante, pois baixos níveis dessa auxina são recomendados para diminuir a variabilidade genética em plantas regeneradas (Paim Pinto et al., 2010; Paim Pinto et al., 2011).

Um diagnóstico rápido para confirmação histoquímica da natureza embriogênica de células é pela utilização do teste de dupla coloração com carmin acético e azul de Evans, em que estruturas que reagem fortemente ao carmin acético possuem características embriogênicas (Durzan, 1988). No presente estudo, as massas pró-embriogênicas de *P. morifolia* cultivadas no meio de indução foram confirmadas pelo teste histoquímico supracitado. A técnica de dupla coloração também tem sido usada com sucesso para diferenciar populações de células embriogênicas das não embriogênicas em *Araucaria angustifolia* (Durzan, 1998; Steiner et al., 2005), *P. cincinnata* (Silva et al., 2009), *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011) e *Pinus pinaster* Ait. (Humánez et al., 2012).

A utilização de técnicas anatômicas e citológicas tem auxiliado o entendimento da embriogênese somática em *Passiflora* spp. (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012a). O conhecimento das camadas de tecidos e células envolvidas no evento morfogênico in vitro, pode facilitar a compreensão dos processos que levam a indução de regeneração, contribuindo para o aumento da eficiência em protocolos de transformação genética (Silva et al., 2009). Em raízes de *P. morifolia* foi observado que as células do periciclo e de tecidos vasculares associados são as responsáveis pela iniciação da embriogênese somática. Esta observação vem de encontro ao relatado sobre o potencial de células pericíclicas nos processos de regeneração em plantas conforme relatado por Sugimoto et al. (2010, 2011), em que sugerem que todo tecido capaz de regenerar in vitro, incluindo cotilédones, pétalas, calos e raízes, na verdade possui uma população de células pré-existentes de identidade semelhante ao periciclo.

Yang et al. (2010) observaram que a formação de embriões somáticos em raízes de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. itálica), em meio contendo 2,4-D, adivinha de divisões periclinais das células do periciclo. O 2,4-D possui a capacidade de promover tais divisões, podendo reativar os meristemas de raízes laterais para formar protuberâncias (Atta et al., 2009). Na organogênese in vitro de raízes de *P. cincinnata* e *P. edulis*, a capacidade do periciclo em regenerar brotações já é bem descrita na literatura (Lombardi et al., 2007; Rocha et al., 2012b).

Segundo Meng et al. (2010) e Savona et al. (2012), além de análises anatômicas e fisiológicas, as técnicas de clonagem gênica e marcadores moleculares podem ser aplicadas para o entendimento molecular dos processos de desenvolvimento na morfogênese in vitro de plantas. O gene *SERK* vem sendo estudado como um possível componente da cascata de sinalização para embriogênese somática, podendo ser utilizado como um marcador de células competentes embriogênicas (Steiner et al., 2012; Ma et al., 2012; Schlögl et al., 2012). Nos últimos anos, ortólogos de genes *SERK* foram descritos em várias espécies, com as sequências de aminoácidos e o padrão de expressão altamente conservado (Nolan et al., 2011; Shi et al., 2012; Steiner et al., 2012). Nossos resultados apontam que a expressão do gene *SERK*, utilizando hibridização in situ com sonda heteróloga, pode ser utilizada como técnica adicional para a confirmação da natureza embriogênica de agregados celulares gerados em raízes de *P. morifolia*. Além disso, os resultados demonstram que o gene *SERK* pode ter um papel importante durante a embriogênese somática em raízes da espécie. Até o presente momento, relatos de trabalhos envolvendo expressão e/ou utilização de hibridização in situ do gene *SERK* para a confirmação da natureza embriogênica de calos de *Passiflora* spp. não foram encontrados na literatura.

Relata-se aqui pela primeira vez na literatura a indução de embriogênese somática em raízes de *P. morifolia*, juntamente com a caracterização morfoanatômica do processo e confirmação molecular, utilizando hibridização in situ. Em futuros trabalhos esforços serão realizados para o isolamento e clonagem do gene *SERK* dos embriões somáticos de *P. morifolia*, utilizando-o como marcador da embriogênese na busca de melhores condições de cultivo para o posterior desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarc'h A, Carnero E, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal* 57: 626-644.
- Avula B, Wang YH, Rumalla C, Smillie T, Khan I (2012) Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids from aerial parts of *Passiflora* species and dietary supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. *Natural Product Communications* 7: 1177-1180.
- Beveridge CA, Mathesius U, Rose RJ, Gresshoff PM (2007) Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 44-51.
- Durzan DJ (1988) Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 6: 341-378.
- Durzan DJ (1998) Process control in somatic polyembryogenesis. In: Ha'llgren JE (ed) Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish: Swedish Proceedings. pp 147-186.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 74: 201-228.
- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib A, Šamaj J (eds) Somatic embryogenesis. Berlin: Springer. pp 85-101.
- Ferreira, DF (2010) SISVAR: Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 47-54.

- Guzzo F, Ceoldo S, Andreetta F, Levi M (2004) In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola* 61: 108-113.
- Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012) Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 373-383.
- Jaroszewski JW, Rasmussen AB, Rasmussen HB, Olsen CE, Jorgensen LB (1996) Biosynthesis of cyanohydrin glucosides from unnatural nitriles in intact tissue of *Passiflora morifolia* and *Turnera angustifolia*. *Phytochemistry* 42: 649-654.
- Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 559-586.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A-138A.
- Ksia E, Harzallah-Skhiri F, Verdeil JL, Gouta H, Alemanno L, Bouzid S (2008) Somatic embryo production from immature seeds of carob (*Ceratonia siliqua* L.): histological evidence. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 401-406.
- Lombardi SP, Passos IRDS, Nogueira MCS, Apezato-da-Glória B (2007) In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 239-247.
- Ma J, He YH, Wu CH, Liu HP, Hu ZY, Shun GM (2012) Cloning and molecular characterization of a *SERK* gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus*. cv. Shenwan. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 195-203.
- Meng L, Zhang S, Lemaux PG (2010) Toward molecular understanding of in vitro in plant shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 108-122.
- Milward-de-Azevedo MA, Baumgratz JFA (2004) *Passiflora* L. Subgênero *Decaloba* (Dc.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia* 55: 17-54.

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

Nakayama F (1966) In vitro tissue culture of *Passiflora caerulea* (in Spanish). *Revista Faculdade Agricola Nacional de La Plata* 42: 63-74.

Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology* 133: 218-230.

Nolan K, Kurdyukov S, Rose R (2011) Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: Implications for development and defence. *BMC Plant Biology* 11: 1-16.

O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty. 357p.

Otoni WC (1995) Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 198p.

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

Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae* 144: 42-47.

Paim Pinto DL, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva MDL, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 71-79.

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

- Pan Z, Zhu S, Guan R, Deng X (2010) Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 145-153.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2011) Photosynthetic characteristics of ornamental passion flowers grown under different light intensities. *Photosynthetica* 49: 593-602.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2012) Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. *Acta Scientiarum* 34: 67-75.
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* 91: 1743-1756.
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim Pinto DL, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738: 425-431.
- Rocha D, Vieira L, Tanaka F, Silva LC, Otoni W (2012a) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249: 747-758.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012b) Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 69-78.
- Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010) Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*. Heidelberg: Springer. pp 3-26.
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falascal G, Rovere FD, Constantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura AMM (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany* 63: 471-488.

Schlögl PS, Santos ALW, Nascimento LV, Guerra MP, Floh EIS (2012) Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 173-180.

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

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

Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LC, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 407-416.

Shi Ya-l, Zhang R, Wu X-p, Meng Z-g, Guo S-d (2012) Cloning and characterization of a *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase* gene in Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Integrative Agriculture* 11: 898-909.

Steiner N, Vieira FN, Maldonado S, Guerra MP (2005) Effect of carbon source affects morphogenesis and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 895-903.

Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2012) A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109: 41-50.

Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* 18: 463-471.

Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology* 21: 212-218.

Tonietto Â, Sato JH, Teixeira JB, Souza EM, Pedrosa FO, Franco OL, Mehta A (2012) Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 1393-1399.

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

Wilkinson DG (1995) RNA detection using non-radioactive in situ hybridization. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 20-23.

Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 49-58.

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

## **CAPÍTULO 2**

**Calogênese em explantes radiculares, prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante em *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae)**

## INTRODUÇÃO

A natureza tem sido uma fonte rica de agentes terapêuticos, e um número considerável de fármacos tem sido desenvolvido a partir de fontes naturais, baseado no uso das plantas na medicina tradicional (Pradhan et al., 2012). O maracujá é tradicionalmente utilizado como planta medicinal na cultura de povos americanos, europeus e asiáticos. Várias propriedades medicinais são atribuídas às espécies comerciais e silvestres de maracujá. A literatura etnofarmacológica relata usos medicinais para diferentes partes da planta, como por exemplo, folhas, flores, raízes e frutos, para combater as mais diferentes enfermidades, do controle de verminoses ao tratamento de tumores gástricos (Dhawan et al., 2004; Costa & Tupinambá, 2005).

O maracujá tem sua origem na América Tropical, pertencendo ao gênero *Passiflora* (Borges et al., 2005), que compreende 24 subgêneros com cerca de 520 espécies distribuídas nas regiões tropicais, destacando-se na família Passifloraceae devido a sua importância econômica (Garcia et al., 2011; Yockteng et al., 2011; Pacheco et al., 2012) e medicinal (Moreira et al., 2012). A espécie *P. incarnata* está descrita em várias farmacopeias (Dhawan et al., 2004), sendo a mais utilizada para fins medicinais. Na quinta edição da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010) constam somente as monografias de *P. edulis* e *P. alata*.

*Passiflora morifolia* Masters ocorre naturalmente na Guatemala, México, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Brasil, Equador, Peru, Paraguai e Argentina (Mondin et al., 2011). A espécie contém grande potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro, pois possui resistência à bacteriose e antracnose, além de apresentar autocompatibilidade com outras Passifloráceas (Junqueira et al., 2005). Sua importância ornamental já está bem descrita na literatura (Pires et al., 2011; Pires et al., 2012). Além disso, *P. morifolia* tem sido apontada como produtora de glicosídeos cianogênicos (Jaroszewski et al., 1996) e de flavonoides (Avula et al., 2012). A presença de flavonoides tem atraído, aos poucos, maior atenção dos pesquisadores no sentido de explorar o potencial uso desta espécie.

Os estudos envolvendo a propagação de espécies vegetais vêm aumentando e, em parte, estão sendo direcionados para a obtenção de plantas clonadas e para a produção de substâncias bioativas, que poderão contribuir para o desenvolvimento de

fármacos. A tecnologia da cultura de células e tecidos vegetais tem sido considerada uma possível ferramenta para estudar a propagação *in vitro* de plantas medicinais, assim como a biossíntese e a produção de metabólitos secundários (Rodrigues & Almeida, 2010; Maneechai et al., 2012).

Apesar das dificuldades na produção de metabólitos secundários *in vitro* por meio de cultura de calos e de células cultivadas em suspensão, o uso de estratégias biotecnológicas combinadas com as técnicas de cultura de tecidos tem resultado no aumento da produção de metabólitos. Algumas delas incluem a seleção de linhagens celulares com maior produtividade da substância de interesse, modificações no meio de cultivo, elicitação, adição de precursores, transformação genética, cultivos em larga escala em biorreatores, cultura de raízes, imobilização celular, dentre outras (Dornenburg & Knorr, 1995; Namdeo et al., 2002; Rao & Ravishankar, 2002; Namdeo, 2007; Weathers et al., 2010; Hussain et al., 2012; Sharma et al., 2013).

Alguns pesquisadores verificaram aumento na produção de metabólitos secundários utilizando a exposição de plantas ou explantes em cultura de tecidos à luz UV. Esta tem sido uma boa estratégia para aumentar a produção de flavonoides (Jaakola et al., 2004; Zhang et al., 2012), alcaloides (Ramani & Chelliah, 2007) e terpenoides (Dolzhenko et al., 2010; Gil et al., 2012). Em estudos realizados com *P. quadrangularis*, foi observado aumento na produção de flavonoides C-glicosilados quando culturas de calos obtidos de folhas foram submetidas à luz UV-B (Antognoni et al., 2007).

Os flavonoides podem apresentar atividades farmacológicas importantes tais como antitumoral, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, vasodilatadora e antiprotozoária (Filho et al., 2001; Zuanazzi & Montanha, 2004; Fotie, 2008). Há uma forte evidência de que o estresse oxidativo, causado pelo excesso de radicais livres, tem um papel importante no desenvolvimento de processos degenerativos, como o envelhecimento, as doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, distúrbios relacionados à idade, entre outros (Commenges et al., 2000). Diante disto, existe grande interesse por substâncias antioxidantes uma vez que elas estão associadas à prevenção e/ou tratamento de várias patologias (Harnafi & Amrani, 2007).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para determinar *in vitro* a atividade antioxidante de extratos vegetais (Duarte-Almeida et al., 2006; Kaur & Geetha, 2006). O ensaio para determinação da capacidade antioxidante via atividade sequestradora do

radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>), originalmente, descrito por Brand-Williams et al. (1995), é um dos métodos mais utilizados devido à sua simplicidade de execução e alta sensibilidade (Sánchez-Moreno, 2002). Ele se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre DPPH<sup>•</sup> (oxidante). Esse processo provoca a redução do DPPH<sup>•</sup> radicalar, levando a uma mudança na coloração da solução de cor violeta para amarela, permitindo a avaliação espectrofotométrica da reação (Duarte-Almeida et al., 2006).

Pesquisas multidisciplinares incluindo a propagação *in vitro*, a prospecção fitoquímica para detecção e/ou quantificação de diferentes classes de metabólitos secundários e a avaliação das propriedades biológicas como, por exemplo, a atividade antioxidante de espécies silvestres de *Passiflora*, poderão contribuir com a exploração e valorização de espécies pouco conhecidas, além de fornecer subsídios para estudos do potencial medicinal.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D na calogênese em explantes radiculares de *P. morifolia* e realizar a prospecção fitoquímica em plantas cultivadas em casa de vegetação e *in vitro*, bem como em calos de raízes submetidos a diferentes tratamentos com luz UV-B. Avaliou-se também se a exposição de calos a luz UV-B seria capaz de estimular a produção de flavonoides C-glicosilados nesta espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desinfestação e germinação *in vitro*

Foram utilizadas sementes maduras colhidas de frutos, pertencentes a plantas com idade aproximada de um ano, crescidas em vasos de 10 L de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças, Vida Verde, Brasil). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

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

Cerca de dez sementes sem tegumento foram transferidas para frascos (250 mL de capacidade), vedados com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm de poros (Milliseal<sup>®</sup>, AVS-045 Air Vent, Japão), contendo aproximadamente 60 mL de meio de cultura composto por sais MS (Murashige & Skoog, 1962) meia força, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 1,5 % (p/v) de sacarose e 0,005% (p/v) de mio-inositol. O pH do meio foi ajustado para 5,8 sendo adicionado 0,25% (p/v) do agente geleificante Phytigel<sup>®</sup>, seguido de autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu no escuro, sob temperatura de  $27 \pm 2$  °C, por um período de 15 dias. Após este tempo, os frascos foram transferidos para o ambiente iluminado da sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 2 lâmpadas de LED com 17W (Vilux<sup>®</sup>, LLTV03, Brasil), sendo mantida a mesma temperatura da germinação.

### Obtenção e secagem do material vegetal de *P. morifolia*

Decorridos 35 dias após a inoculação das sementes para a germinação, foi realizada a separação das folhas, caules e raízes das vitroplantas de *P. morifolia*. Esses

órgãos foram submetidos à secagem em estufa ventilada (ACBLABOR, Brasil) a 40 °C por 8 dias, para a obtenção de material vegetal seco.

O material vegetal ex vitro foi retirado de plantas sadias, apresentando crescimento vegetativo e idade aproximada de um ano e meio, sendo crescidas nas mesmas condições de cultivo das plantas utilizadas na obtenção de sementes no experimento de germinação. As plantas tiveram as folhas, caules e raízes separados e submetidos à secagem nas mesmas condições descritas acima para o material vegetal de vitroplantas.

### **Indução de calos em raízes de *P. morifolia***

Decorridos 35 dias após a inoculação das sementes para a germinação, as raízes principais das vitroplantas foram excisadas e segmentadas em fragmentos de 8 a 10 mm. Os explantes radiculares foram inoculados em placas de Petri de poliestireno estéreis (J. Prolab, 90 x 15 mm, Brasil), vedadas com filme plástico transparente PVC (Goodyer, Brasil), contendo aproximadamente 30 mL de meio MS, complexo vitamínico B5, 3% (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol e diferentes concentrações (0; 4,52; 6,78; 9,04 e 11,3 µM) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e acrescido 0,25% (p/v) de Phytigel<sup>®</sup>, antes da autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min. A incubação das placas foi realizada no escuro, em câmara de crescimento (Forma Scientific, 3740, EUA) e sob temperatura de 27 ± 2 °C.

Decorridos 120 dias após a incubação das placas, foram avaliados os efeitos dos tratamentos na formação de calos em raízes. As variáveis analisadas foram porcentagem de explantes com formação de calos e de calos friáveis.

Os calos formados no meio com 6,78 µM de 2,4-D foram subcultivados em placas de Petri (90 x 15 mm), vedadas com filme plástico transparente PVC, contendo aproximadamente 30 mL do meio MS, na mesma composição do meio de indução. No entanto, os reguladores adicionados foram o 2,4-D na concentração de 6,78 µM combinado com cinetina a 2,32 µM. A incubação das placas foi realizada em sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes tubulares de 20W (Luz do dia especial,

Osram, Brasil) e temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Cada placa foi inoculada com 10 calos, sendo estes repicados em intervalos regulares de 20 dias.

### **Determinação da curva de crescimento dos calos de *P. morifolia***

O crescimento in vitro, em termos de massa fresca, foi monitorado ao longo do tempo. Uma amostra dos calos, obtidos no meio de indução, foi repicada em 12 placas de Petri contendo aproximadamente 30 mL do meio MS, mantendo a mesma composição e condições de incubação descritas anteriormente para o meio de subcultivo. Cada placa continha 10 calos que foram pesados em intervalos regulares de 5 dias, até o vigésimo dia após a inoculação.

### **Exposição dos calos de raízes a diferentes tratamentos utilizando luz UV-B**

Placas de Petri contendo aproximadamente 30 mL do meio de subcultivo foram inoculadas com 10 calos cada uma. As placas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes tubulares de 20W (Luz do dia especial, Osram, Brasil) e temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Decorridos 15 dias após o período de incubação, as placas foram transferidas para a câmara de UV sob a irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 4 lâmpadas tubulares fluorescentes (Philips, TL-D/75-650, China) e 5 lâmpadas tubulares UV-B (SankyoDenki, G15T8E, Japão), ambas contendo 43,6 cm de comprimento e 15 W de potência. O controle para os tratamentos foi realizado em sala de crescimento sob irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 2 lâmpadas tubulares fluorescentes de 110 W (HO Sylvania, T12, Brasil). A temperatura durante todo o experimento foi mantida em  $27 \pm 2$  °C. Tanto a radiação UV-B quanto a radiação visível foram providenciadas continuamente. Os tratamentos consistiram de 6, 12 e 24 horas de exposição à radiação UV-B. Após a imposição dos tratamentos, as placas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento, sendo mantidas as mesmas condições descritas inicialmente após a inoculação dos calos. Decorridos 5 dias após a incubação, os calos dos diferentes tratamentos e controles foram separados e secos a 40 °C por 8 dias em estufa de circulação forçada (ACBLABOR, Brasil).

## **Delineamento experimental**

O experimento de calogênese foi constituído por 5 tratamentos (0; 4,52; 6,78; 9,04 e 11,3  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) com 10 repetições, sendo a unidade experimental composta por uma placa de Petri, contendo 8 segmentos radiculares cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste Tukey a 5% de significância. O experimento foi repetido três vezes.

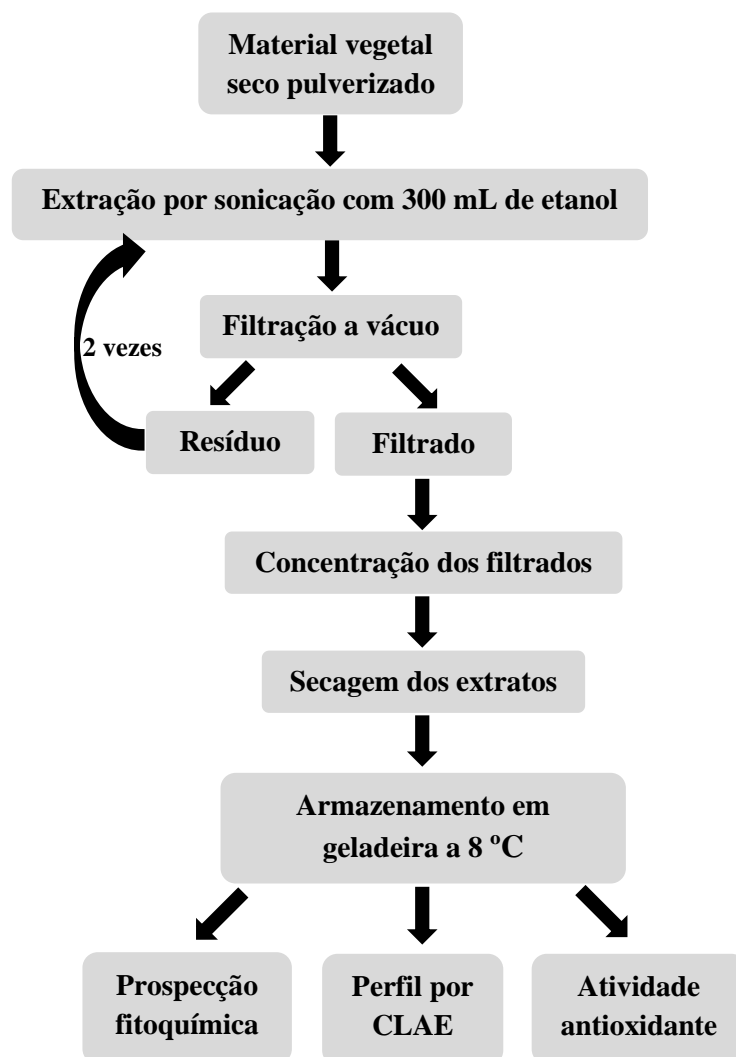
O experimento de exposição dos calos a luz UV-B foi constituído por 3 tratamentos (6, 12 e 24 horas) com 5 repetições de uma placa contendo 10 calos em cada. O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

## **Obtenção dos extratos de *P. morifolia***

O material vegetal seco (folhas, caules, raízes e calos de raízes) foi pulverizado em gral de vidro. Pesaram-se 900 mg do pó resultante em béquer de 600 mL utilizando balança semi-analítica (Mettler Toledo, PB3002, Brasil). Adicionaram-se, então, 300 mL de álcool etílico comercial (92,8% v/v) e o conteúdo foi homogeneizado e sonificado (Unique, Maxiclean1400, Brasil) por 10 min. Em seguida, a suspensão foi filtrada a vácuo e repetiu-se o procedimento de extração, por mais duas vezes, utilizando o resíduo obtido. Os filtrados foram combinados e concentrados em sistema de evaporação rotatória (Büchi, B-480, com recirculador *Chiller*, F-108 e bomba com controlador de vácuo, V700, Suíça) sob pressão reduzida e temperatura de 40 °C.

Os extratos obtidos foram transferidos para frascos tipo cintilação com capacidade de 20 mL (Sigma Chemical Company, EUA) e o solvente reduzido em concentrador SpeedVac<sup>®</sup> (ThermoScientific, SPD131DDA, EUA) por 4 horas a 40 °C. Em seguida, os extratos foram transferidos para o banho maria (Marconi, MA156, Brasil) a temperatura de 40 °C até a evaporação completa do solvente. Os extratos foram mantidos em dessecador sob vácuo para remoção de solvente residual e, posteriormente, armazenados em geladeira a temperatura de 8 °C. As etapas do preparo dos extratos estão representadas no fluxograma da Figura 1.



**Figura 1** - Fluxograma das etapas de obtenção dos extratos de *P. morifolia*.

### **Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)**

A prospecção fitoquímica foi realizada nos extratos de folhas, caules e raízes de plantas de casa de vegetação e de vitroplantas bem como nos extratos de calos de uma repetição de cada tratamento (controle e UV-B), objetivando identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes, segundo metodologia descrita por Wagner & Bladt, (2001). Foram utilizadas cromatoplaças de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Alemanha).

Para o preparo dos padrões de vitexina, isovitexina, isorientina (Chromadex, EUA) e orientina (Extrasynthese, França), pesou-se 1,0 mg de cada substância, diretamente para tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade adicionando-se, então, 1,0

mL de metanol grau CLAE. Os padrões foram solubilizados com o auxílio de banho de ultrassom, durante 10 min.

Para o preparo das amostras, foram pesadas 5,0 mg do extrato seco obtido anteriormente, diretamente para tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade, seguindo os mesmos procedimentos anteriormente descritos para o preparo dos padrões.

Uma alíquota de 2,5 µL de cada solução padrão e de 30 µL de cada amostra foi aplicada nas cromatoplasmas com ajuda de uma micropipeta. Entre cada ponto de aplicação foi deixado um espaço de 1,0 cm. Todas as cromatoplasmas foram eluídas em cuba cromatográfica previamente saturada.

As condições cromatográficas utilizadas para cada classe de metabólitos secundários estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Condições cromatográficas utilizadas na prospecção fitoquímica de extratos de *P. morifolia*

Classes de metabólitos secundários	Eluente	Revelador	Amostra de referência
Cumarinas	CH <sub>3</sub> Ø: CHCl <sub>3</sub> : CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (11: 4: 4)	Solução de KOH a 5% em EtOH*	Cumarina (1,2-benzopirona)
Compostos antracênicos	AcOEt: MeOH: H <sub>2</sub> O (81: 11: 8)	Solução de KOH a 5% em EtOH*	Antraquinona
Triterpenos e esteroides	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Reagente de Liebermann-Burchard <sup>1</sup>	β-sitosterol
Saponinas	CHCl <sub>3</sub> : AcOEt: MeOH: H <sub>2</sub> O (112: 60: 22: 15)	Anisaldeído-ácido sulfúrico	<i>Centella asiatica</i>
Flavonoides	AcOEt: HCOOH: HAc: H <sub>2</sub> O (45: 5: 5: 12)	NP e PEG <sup>*2</sup>	Vitexina, isovitexina, orientina, isorientina
Taninos	CH <sub>3</sub> -Ø: BuOH: HAc: H <sub>2</sub> O (50: 25: 25: 5)	Soluções aquosas de K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> a 1% e FeCl <sub>3</sub> a 2% (1:1)	Ácido tânico
Alcaloides	AcOEt: MeOH: H <sub>2</sub> O (47,5: 7,5: 5,5)	Reagente de Dragendorff <sup>3</sup>	Sulfato de atropina e sulfato de quinino

AcOEt: acetato de etila; CO(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: acetona; HAc: ácido acético; HCOOH: ácido fórmico; H<sub>2</sub>O: água; BuOH: butanol; CHCl<sub>3</sub>: clorofórmio; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano; EtOH: etanol; MeOH: metanol; CH<sub>3</sub>-Ø: tolueno.

\*Visualização sob luz UV λ 366 nm.

<sup>1</sup>Reagente de Liebermann-Burchard: anidrido acético: ácido sulfúrico: etanol absoluto (1: 1: 8) (Wagner & Bladt, 2001).

<sup>2</sup>Polietilenoglicol 4.000 (PEG) 5% em etanol. Difenilboriloxietilamina (NP) 1% em metanol.

<sup>3</sup>Reagente de Dragendorff: sal de bismuto + ácido acético + iodeto de potássio (Wagner & Bladt, 2001).

## **Avaliação da presença de flavonoides C-glicosilados em extratos de *P. morifolia* por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)**

Amostras do extrato seco (10 mg) foram pesadas diretamente em tubos Eppendorf e solubilizadas em metanol grau CLAE. Todas as amostras foram solubilizadas com o auxílio de banho de ultrassom, durante 10 min e, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min. Os cromatogramas foram registrados para os sobrenadantes resultantes, dos quais foram injetadas alíquotas de 10 µL de forma automática em sistema de CLAE.

Para a obtenção dos perfis cromatográficos utilizou-se o equipamento de CLAE (Agilent Technologies, 1200, EUA), equipado com um detector UV-DAD que promoveu uma varredura de comprimento de onda entre 190 e 400 nm, sendo a detecção realizada no UV a 210, 254, 280 e 350 nm. A coluna utilizada para a separação foi a Zorbax XDC-C18 (50 x 4,6 mm, d.i., 1,8 µm), com fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 40 °C. O tempo médio da corrida foi de 55 minutos, sendo os dados integrados por meio do “software” ChemStation. Utilizou-se um gradiente linear de água: metanol, acidificados com 0,2% de ácido fórmico (Tabela 2), visando detectar a presença de flavonoides. Foi guardado um intervalo de 10 minutos entre cada injeção para reequilibrar a coluna. As soluções padrão de vitexina, isovitexina, orientina e isorientina (Extrasynthese, França) foram usadas para identificar a presença destes flavonoides nos extratos de folhas, caules, raízes e calos de raízes, sendo injetadas alíquotas de 10 µL de forma automática no sistema de CLAE.

**Tabela 2** - Gradiente de eluição para a obtenção dos cromatogramas de extratos de *P. morifolia* e padrões de flavonoides por CLAE-FR

<b>Tempo (min)</b>	<b>Acido fórmico 0,2% em água (%)</b>	<b>Acido fórmico 0,2% em metanol (%)</b>
0	95	5
45	5	95
50	5	95
55	95	5

Os resultados de identificação por CLAE-FR foram visualizados pela apresentação dos cromatogramas obtidos para cada amostra, sendo que para os extratos de calos foi apresentado apenas um cromatograma de cada repetição.

### **Avaliação da atividade antioxidante com DPPH<sup>•</sup> em folhas, caules, raízes e calos de raízes de *P. morifolia***

Para o preparo das amostras foram pesados, em triplicata, 1,4 mg dos extratos de calos de raízes em tubos tipo Eppendorf e solubilizados em 1,0 mL de metanol P.A. com auxílio de banho de ultrassom por 10 minutos. A solução obtida foi diluída para concentração de 280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com metanol P.A. (solução mãe). A partir dessa, foram preparadas 3 soluções diluídas nas concentrações de 175, 350 e 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$  correspondente a concentração final no poço 125, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos constituintes dos extratos em sequestrar o radical estável DPPH<sup>•</sup>. Para o ensaio foram preparadas uma solução estoque de DPPH<sup>•</sup> na concentração de 0,12 mg  $\text{mL}^{-1}$  e uma solução de pirogallol (controle positivo) a 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , correspondente a concentração final de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O solvente das amostras, metanol P.A., foi utilizado como controle negativo. Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras (preparadas em triplicata) e dos controles positivo e negativo foram transferidas para microplacas de poliestireno com 96 cavidades (TPP, Suíça) em duplicata. Na primeira replicata adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH<sup>•</sup> (poços de reação) e, na segunda, 100  $\mu\text{L}$  de metanol (branco das amostras).

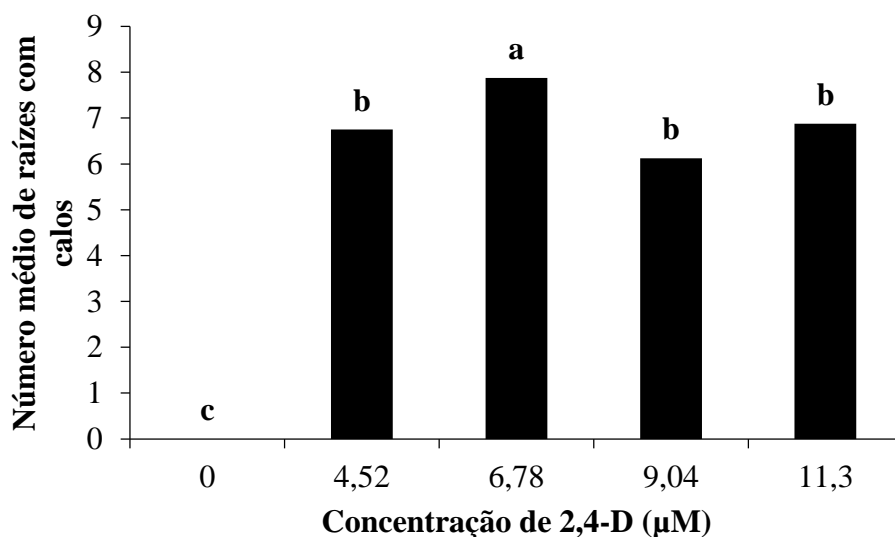
A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Biotek, ELX808, EUA) em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 515 nm, a cada 5 minutos, por um intervalo de 45 minutos. O resultado das análises foi registrado utilizando o “software” Gen5 1.05.

O percentual de DPPH<sup>•</sup> remanescente foi calculado por meio de uma curva de calibração preparada com 6, 12, 24, 42, 60, 84 e 102  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DPPH<sup>•</sup>.

## RESULTADOS

### Indução de calos em raízes de *P. morifolia*

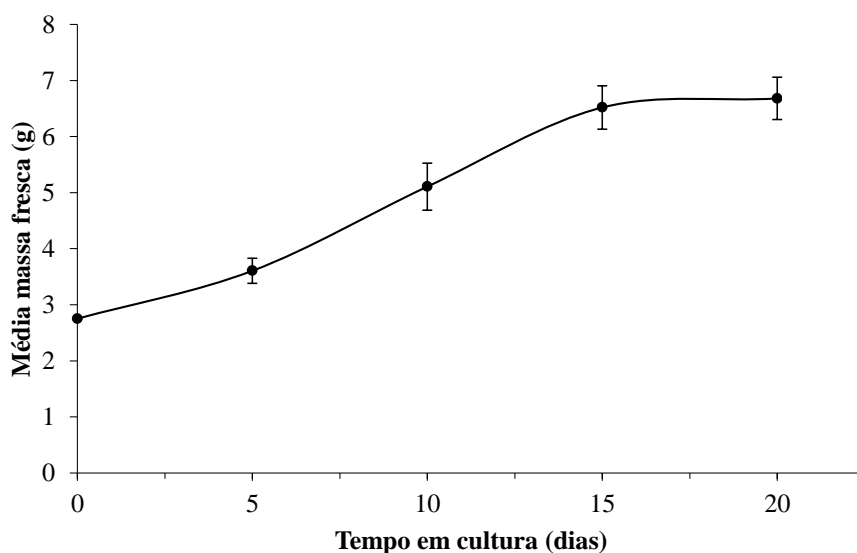
Após 30 dias de cultivo, em todas as concentrações de 2,4-D testadas, foi observado o crescimento de raízes laterais nos explantes inoculados. Decorridos 60 dias, ao longo do explante inicial e das raízes laterais, foi observada a formação de calos que apresentavam coloração amarela esbranquiçada. Ao final de 120 dias de incubação, foram verificadas diferenças significativas no número de raízes com formação de calos (Fig. 2). A calogênese não ocorreu na ausência do regulador de crescimento. No entanto, com 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, em média 98% das raízes formaram calos (Fig. 2).



**Figura 2** - Média por placa do número de raízes de *Passiflora morifolia* Masters apresentando formação de calos, após 120 dias no meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Cada placa foi inicialmente inoculada com 8 explantes radiculares.

Em todos os tratamentos com 2,4-D, 100% dos calos possuíam aspecto friável. No entanto, quando esses foram subcultivados no meio MS contendo 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e incubados no escuro, demandavam em torno de 70 dias de incubação para atingirem em média 700 mg de massa fresca. Diante do elevado tempo de crescimento, foi

adicionado 2,32  $\mu\text{M}$  de cinetina ao meio de subcultivo dos calos, sendo a incubação realizada em sala de crescimento iluminada. Nestas condições, os calos atingiram a média de 650 mg de massa fresca ao redor do vigésimo dia (Fig. 3).



**Figura 3** - Curva de crescimento dos calos obtidos de raízes de *Passiflora morifolia* Masters no meio MS suplementado com 6,78  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2,32  $\mu\text{M}$  de cinetina. Cada valor é a média da massa fresca  $\pm$  desvio padrão de 12 determinações de uma placa com 10 calos.

### Rendimento em extrativos

Em geral, os extratos etanólicos obtidos por sonicação apresentaram-se como um resíduo viscoso e higroscópico. Observou-se que os extratos de folhas e caules, de vitroplantas e de plantas de casa de vegetação, apresentaram a coloração verde-escura, assim como o de raízes de vitroplantas. Entretanto, o extrato de raízes de plantas de casa de vegetação apresentou a cor marrom. As massas dos extratos e os rendimentos em extrativos constam na Tabela 3.

**Tabela 3** - Rendimentos em extrativos dos extratos etanólicos de folhas, caules e raízes de *P. morifolia*

Origem	Amostras	Massa (g) do extrato etanólico	Rendimento extrativo (% p/p)
Plantas cultivadas em casa de vegetação	Folhas	3,47	34,7
	Caules	2,91	29,1
	Raízes	0,32	18,5
Vitroplantas	Folhas	0,20	22,85
	Caules	0,22	24,29
	Raízes	0,26	28,64

Os extratos de calos de raízes apresentaram a coloração marrom e suas massas e rendimentos em extrativos encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4** - Média dos rendimentos em extrativos dos extratos etanólicos de calos de raízes de *P. morifolia*

Origem	Amostras	Massa média (g) do extrato etanólico	Média do rendimento extrativo (% p/p)
Controle luz visível	Calos 6 h	0,35	39
	Calos 12 h	0,28	31
	Calos 24 h	0,29	32
Tratamento luz UV-B	Calos 6 h	0,38	42
	Calos 12 h	0,36	40
	Calos 24 h	0,32	35

### Prospecção fitoquímica

Na prospecção fitoquímica por CCD constatou-se a presença de triterpenos, esteroides, saponinas e flavonoides nos extratos etanólicos de folhas e raízes de plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação bem como nos extratos de folhas, caules e raízes de vitroplantas. Entretanto, nos extratos de caules de plantas de casa de vegetação foi detectada apenas a presença de flavonoides. Na Tabela 5, foram reunidos os resultados obtidos da prospecção fitoquímica realizada com os extratos de diferentes órgãos provenientes de plantas de casa de vegetação e de vitroplantas.

**Tabela 5** - Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos de folhas, caules e raízes de *P. morifolia*

Classes de metabólitos secundários	Plantas de casa de vegetação			Vitroplantas		
	Folhas	Caules	Raízes	Folhas	Caules	Raízes
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Compostos antracênicos	-	-	-	-	-	-
Triterpenos e esteroides	+	-	+	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-

+ (presença); - (ausência).

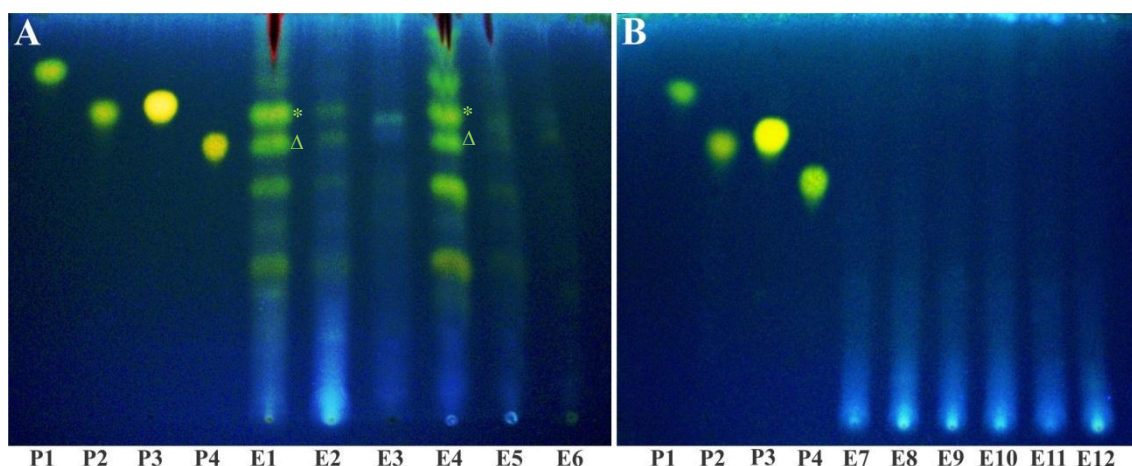
Triterpenos e esteroides foram detectados no extrato etanólico de calos de raízes submetidos ao tratamento com UV-B por um período de 6 horas, sendo também detectadas saponinas nos tratamentos de 6 e 12 horas com luz UV-B (Tabela 6). Nos demais extratos de calos de raízes não foi detectada a presença de nenhuma classe de metabólitos secundários nas repetições avaliadas. Este resultado também foi observado para os extratos de calos expostos à radiação visível durante 6, 12 e 24 horas, que foram utilizados como controle dos tratamentos. A Tabela 6 apresenta os resultados da prospecção fitoquímica realizada com os extratos de calos de raízes.

**Tabela 6** - Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos de calos de raízes de *P. morifolia*

Classes de metabólitos secundários	Controle (luz visível)			Tratamento (luz UV-B)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Compostos antracênicos	-	-	-	-	-	-
Triterpenos e esteroides	-	-	-	+	-	-
Saponinas	-	-	-	+	+	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-

+ (presença); - (ausência).

Os flavonoides têm sido uma das classes de metabólitos secundários de maior destaque na literatura referente às espécies de *Passiflora*. Considerando a importância desta classe de metabólitos para o gênero *Passiflora*, escolheu-se ilustrar os resultados obtidos na prospecção fitoquímica, por meio de fotografias das placas de CCD, caracterizando os flavonoides nos extratos de folhas, caules e raízes de plantas de casa de vegetação e de vitroplantas bem como nos extratos de calos de raízes de *P. morifolia*. As condições cromatográficas empregadas permitiram uma boa separação das manchas sob luz visível nos vários extratos. Após a revelação das placas de CCD com o reagente para produtos naturais NP/PEG, foram visualizadas várias manchas com fluorescência característica de flavonoides sob luz ultravioleta (UV<sub>366nm</sub>). Observou-se maior número de manchas bem definidas e intensas, principalmente, nos extratos de folhas em ambas as condições de cultivo, revelando haver certa semelhança nos dois perfis cromatográficos (Fig. 4A).



**Figura 4** - Perfis cromatográficos, obtidos por CCD, para padrões de flavonoides e extratos de *Passiflora morifolia* Masters. **A:** Amostras de plantas cultivadas em casa de vegetação (CV) e de vitroplantas (VP). **B:** Amostras de calos de raízes. **Legenda - P1:** Vitexina; **P2:** Isovitexina; **P3:** Orientina; **P4:** Isorientina; **E1:** Extrato de folhas (CV); **E2:** Extrato de caules (CV); **E3:** Extrato de raízes (CV); **E4:** Extrato de folhas (VP); **E5:** Extrato de caules (VP); **E6:** Extrato de raízes (VP); **E7:** Extrato de calos 6 h (controle); **E8:** Extrato de calos 12 h (controle); **E9:** Extrato de calos 24 h (controle); **E10:** Extrato de calos 6 h (UV-B); **E11:** Extrato de calos 12 h (UV-B); **E12:** Extrato de calos 24 h (UV-B). **Símbolos - \*:** Manchas com fluorescência amarelo-esverdeada (E1) e Rf (“Retardation fator”) próximo ao do padrão isovitexina (P2); **Δ:** Manchas com fluorescência amarelo-esverdeada (E4) e Rf próximo ao do padrão isorientina (P4).

É interessante ressaltar que foram observadas 6 manchas com fluorescência amarelo-esverdeada bem pronunciadas no extrato etanólico de folhas de vitroplantas (E4) (Fig. 4A). Entretanto, no extrato das folhas de plantas de casa de vegetação (E1) foram visualizadas 8 manchas com fluorescência semelhante à observada acima, sendo 4 delas bem definidas e outras 4 com menor intensidade (Fig. 4A). Nos extratos de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação e de vitroplantas (E1 e E4), observaram-se manchas com fluorescência amarelo-esverdeada ( $Rf_{E1}^* = 0,70$ ;  $Rf_{E4}^* = 0,70$ ), semelhante a que foi observada para o padrão de isovitexina ( $Rf_{P2} = 0,72$ ). Nos mesmos extratos também foram visualizadas outras manchas com fluorescência amarelo-esverdeada ( $Rf_{E1}^{\Delta} = 0,64$  e  $Rf_{E4}^{\Delta} = 0,63$ ) e Rf próximo ao valor do padrão de isorientina ( $Rf_{P4} = 0,64$ ) (Fig. 4A).

Os extratos de caule, para ambas as condições de cultivo, mostraram perfis cromatográficos parecidos com os perfis das folhas no que diz respeito à coloração da fluorescência. Nos dois extratos foram visualizadas 4 manchas com fluorescência amarelo-esverdeada pouco intensas (E2) (Fig. 4). Esse resultado sugere, possivelmente, uma menor concentração de flavonoides no caule, em ambas as condições de cultivo, em comparação com o resultado obtido para folhas.

A raiz foi o órgão vegetal que mais diferiu dos demais. Foram visualizadas 2 manchas com fluorescência amarelo-esverdeada de pouca intensidade no extrato de raízes de casa de vegetação (E3). As mesmas manchas puderam ser observadas no perfil cromatográfico do extrato de raízes de vitroplantas (E6), porém menos intensas (Fig. 4). Esses resultados podem sugerir que a concentração de flavonoides nas raízes de plantas cultivadas em ambas as condições, provavelmente, é muito pequena.

No perfil cromatográfico dos extratos de calos de raízes (E7, E8, E9, E10, E11 e E12) não foi possível visualizar mancha com fluorescência característica dos flavonoides relatados nas espécies de *Passiflora*. Foi constatada a presença de fluorescência azul próximo ao ponto de aplicação nos seis extratos de calos (Fig. 4). Entretanto, não foi possível identificar as substâncias que poderiam ser responsáveis pela fluorescência observada.

### **Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (CLAE-FR)**

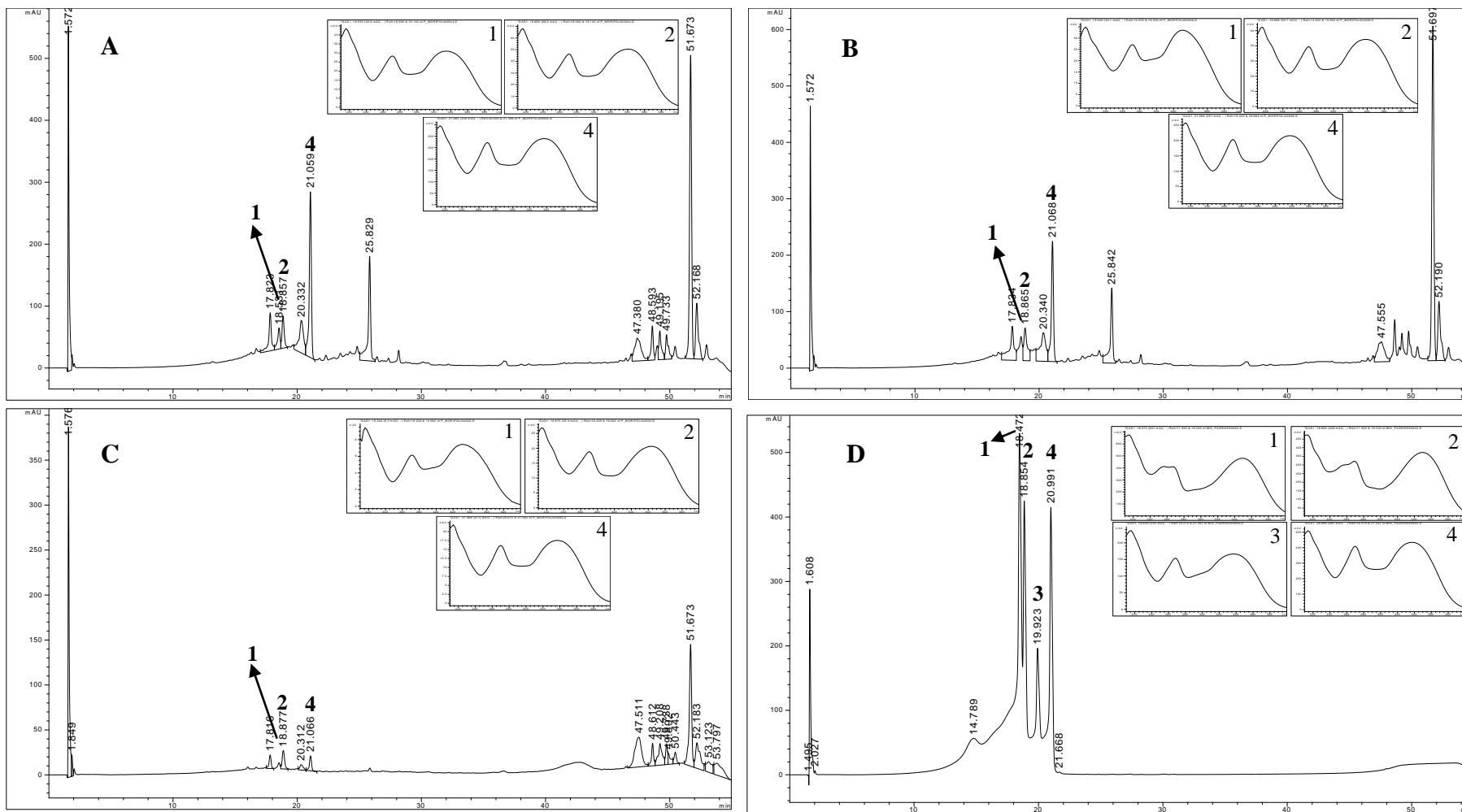
As condições cromatográficas promoveram a separação dos componentes das amostras, e as análises dos espectros de absorção no UV permitiram identificar flavonoides nos extratos de folhas, caules e raízes de plantas e de vitroplantas (Fig. 5 e Fig. 6). Nestes extratos, todos os picos contidos no intervalo entre 16 e 26 minutos, continham espectro de absorção característico de flavonoides com duas bandas principais com máximos de absorção em torno de 270 e 340 nm.

Os extratos de folhas e caules de plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram perfis cromatográficos bastante semelhantes (Fig. 5), com predomínio de picos com tempos de retenção entre 16 e 26 minutos, referentes a substâncias de média polaridade, e acima de 45 minutos, referentes a substâncias de polaridade mais baixa. Nesses extratos, entre 16 e 26 minutos, observou-se a presença de dois picos majoritários. Nas folhas estes picos apresentavam tempos de retenção (Tr) de 21,059 minutos e 25,829 minutos, e nos caules o Tr era de 21,068 minutos e 25,842 minutos. Os dois picos com menor Tr foram identificados como sendo referentes a isovitexina (pico 4). Os outros dois picos não corresponderam a nenhum dos padrões utilizados. Observou-se também a presença dos flavonoides orientina (pico 1) e isorientina (pico 2) nos extratos supracitados, em menor intensidade. No cromatograma registrado para o extrato de raízes de plantas de casa de vegetação, observou-se a presença de picos

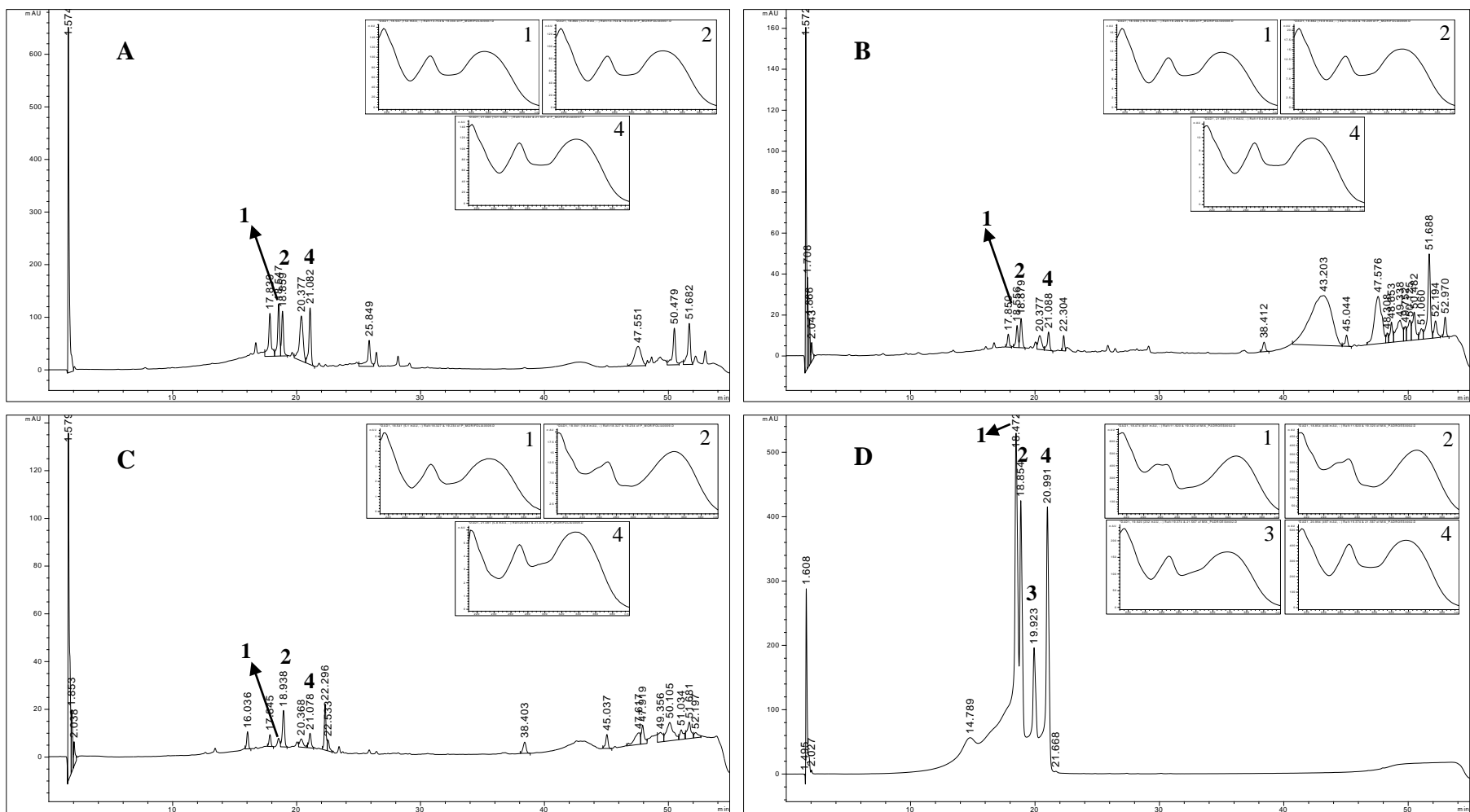
pouco intensos, na faixa entre 16 e 26 minutos, sem predominância de nenhum pico nesta faixa (Fig. 5). Entretanto, foi possível identificar picos que correspondiam à orientina (pico 1), isorientina (pico 2) e isovitexina (pico 4). Esses resultados estão em concordância com o perfil obtido por CCD.

Os cromatogramas obtidos para os extratos de folhas, caules e raízes de vitroplantas apresentaram picos, de pequena intensidade, podendo ser identificados os flavonoides orientina (pico 1), isorientina (pico 2) e isovitexina (pico 4), mas, sem predomínio de qualquer constituinte (Fig. 6). Quando realizada a comparação dos perfis cromatográficos dos mesmos órgãos vegetais advindos de plantas em diferentes condições de cultivo, observa-se que a composição química qualitativa foi semelhante (Fig. 5 e Fig. 6). No entanto, foram observadas alterações quantitativas significativas. Esse resultado sugere menor teor de flavonoides nos órgãos de vitroplantas (Fig. 6).

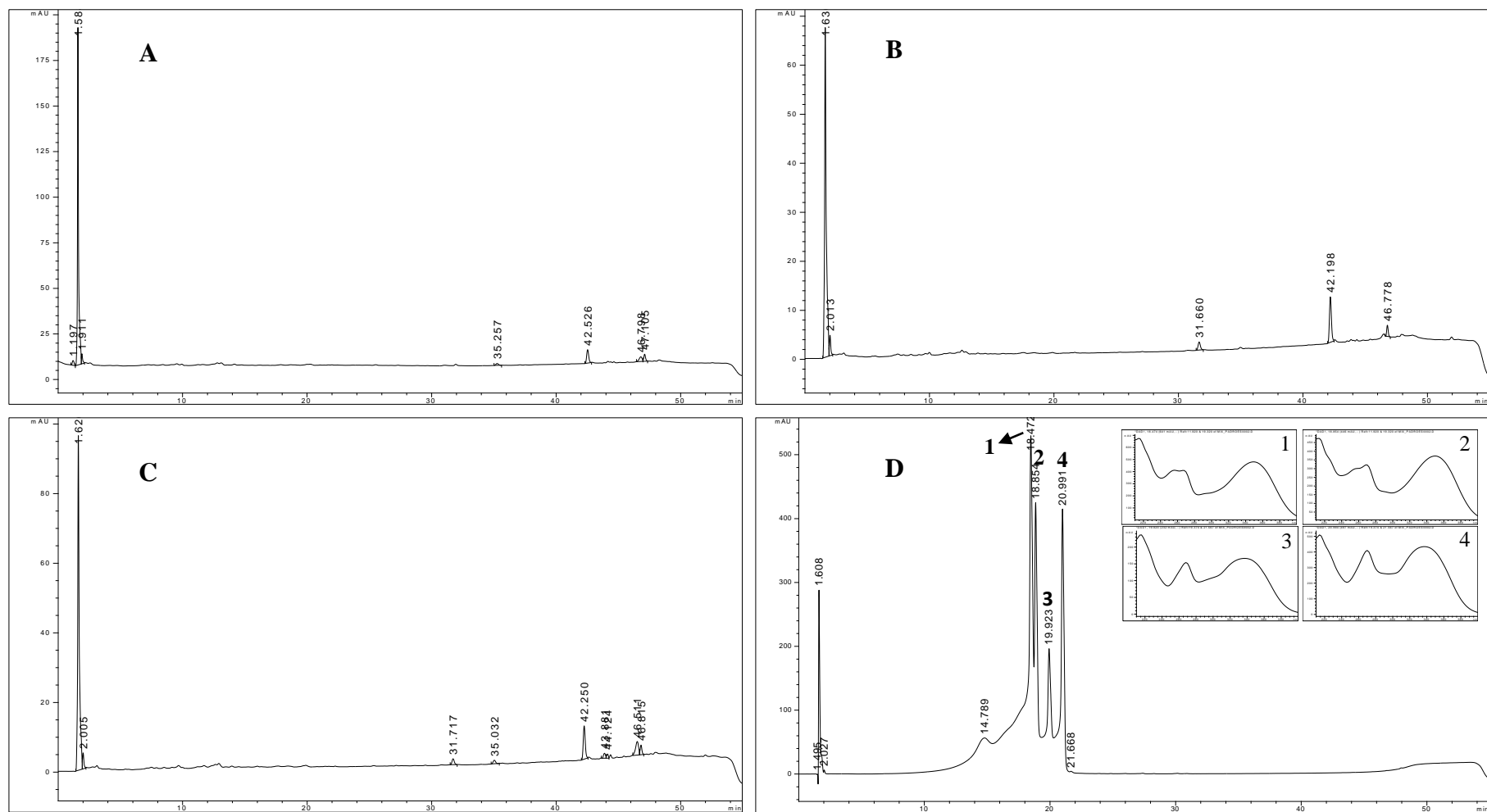
A análise dos cromatogramas obtidos para os extratos de calos de raízes (controle e tratamento com UV) mostrou a presença de poucos picos, a maior parte destes com tempo de retenção superior a 30 minutos (Fig. 7 e Fig. 8). Não foi possível identificar nenhum pico com tempo de retenção e espectro de absorção no UV característico de flavonoides. No entanto, em ambos os tratamentos (controle e UV), foram visualizados diferentes picos distribuídos aleatoriamente entre as amostras (Fig. 7 e Fig. 8). Não foi possível realizar a identificação dos constituintes presentes nos extratos de calos obtidos de raízes de *P. morifolia*.



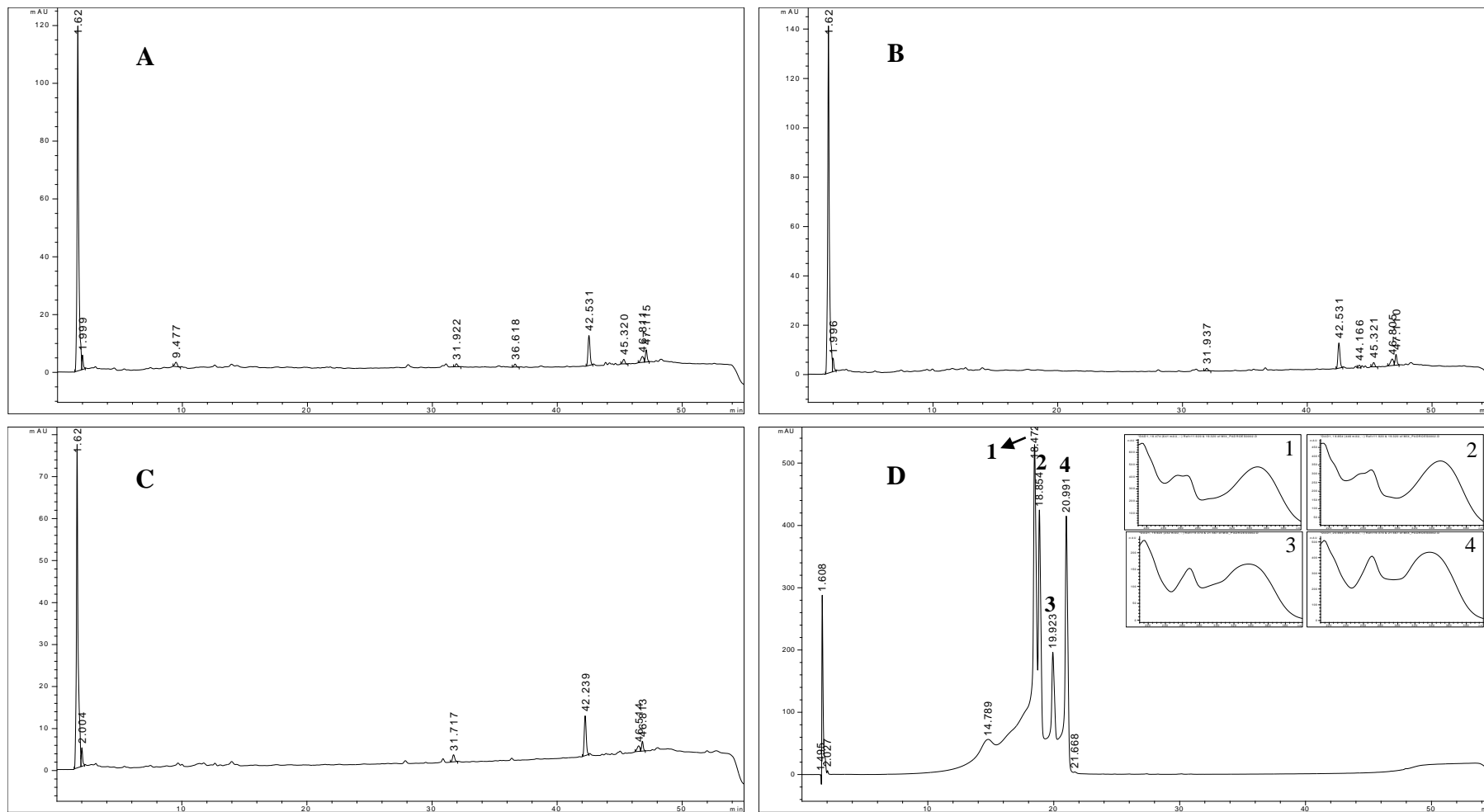
**Figura 5** - Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-FR para os extratos de diferentes órgãos de *Passiflora morifolia* Masters cultivada em casa de vegetação. **A:** Extrato de folhas. **B:** Extrato de caules. **C:** Extrato de raízes. **D:** Padrões de flavonoides, orientina (Tr = 18,472 minutos), isorientina (Tr = 18,854 minutos), vitexina (Tr = 19,923 minutos) e isovitexina (Tr = 20,991 minutos). Detecção: 254 nm. Condições cromatográficas: vide parte experimental (página 46).



**Figura 6** – Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-FR para os extratos de diferentes órgãos de *Passiflora morifolia* Masters cultivada in vitro. **A:** Extrato de folhas. **B:** Extrato de caules. **C:** Extrato de raízes. **D:** Padrões de flavonoides, orientina (Tr = 18,472 minutos), isorientina (Tr = 18,854 minutos), vitexina (Tr = 19,923 minutos) e isovitexina (Tr = 20,991 minutos). Detecção: 254 nm. Condições cromatográficas: vide parte experimental (página 46).



**Figura 7** - Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-FR para os extratos de calos de raízes de *Passiflora morifolia* Masters. **A**: Extrato de calos 6 h (controle); **B**: Extrato de calos 12 h (controle); **C**: Extrato de calos 24 h (controle); **D**: Padrões de flavonoides, orientina (Tr = 18,472 minutos), isorientina (Tr = 18,854 minutos), vitexina (Tr = 19,923 minutos) e isovitexina (Tr = 20,991 minutos). Detecção: 254 nm. Condições cromatográficas: vide parte experimental (página 46).

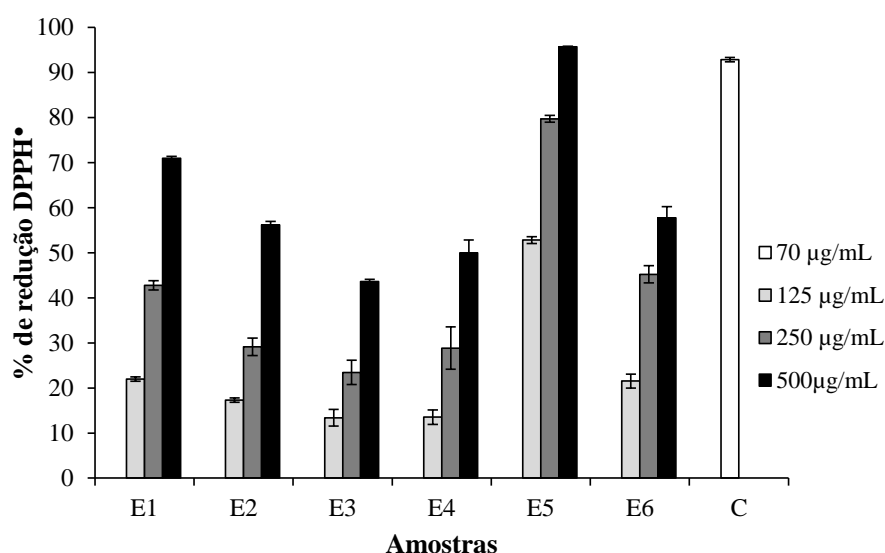


**Figura 8** - Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-FR para os extratos de calos de raízes de *Passiflora morifolia* Masters. **A:** Extrato de calos 6 h (UV-B); **B:** Extrato de calos 12 h (UV-B); **C:** Extrato de calos 24 h (UV-B); **D:** Padrões de flavonoides, orientina (Tr = 18,472 minutos), isorientina (Tr = 18,854 minutos), vitexina (Tr = 19,923 minutos) e isovitexina (Tr = 20,991 minutos). Detecção: 254 nm. Condições cromatográficas: vide parte experimental (página 46).

## Ensaio da atividade antioxidante com DPPH<sup>\*</sup>

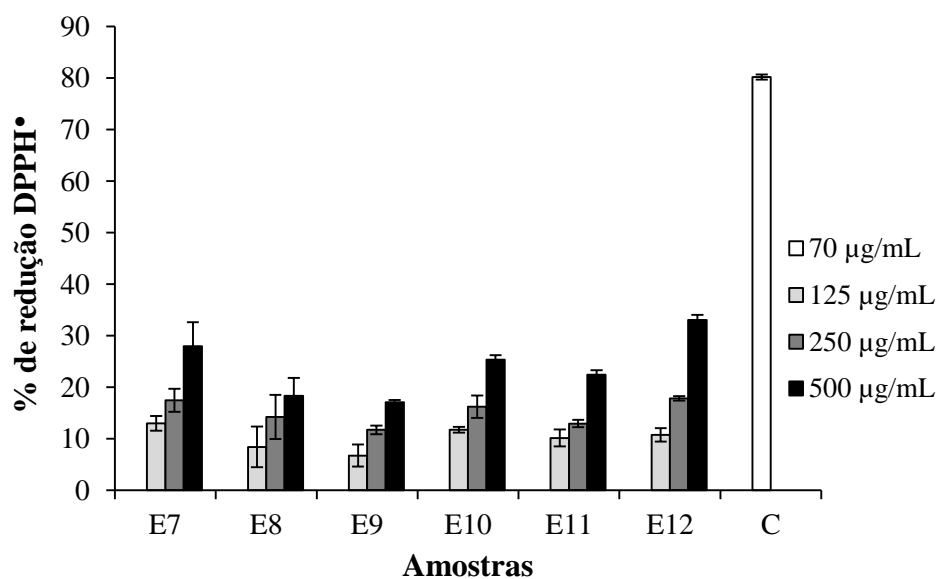
Pela análise do ensaio de atividade antioxidante foi observado que para plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação, o extrato de folhas foi o que apresentou a maior capacidade de redução do DPPH<sup>\*</sup>, seguido pelo extrato de caules e por último o de raízes (Fig. 9).

No entanto, para vitroplantas, o extrato de caules foi o que apresentou a maior capacidade de redução do DPPH<sup>\*</sup>, seguido pelo extrato de raízes e por último o de folhas (Fig. 9).



**Figura 9** - Percentual de redução do DPPH<sup>\*</sup> em função de diferentes concentrações dos extratos de *Passiflora morifolia* Masters cultivada em casa de vegetação (CV) e in vitro (VP). **Legendas** - **E1**: Extrato de folhas (CV); **E2**: Extrato de caules (CV); **E3**: Extrato de raízes (CV); **E4**: Extrato de folhas (VP); **E5**: Extrato de caules (VP); **E6**: Extrato de raízes (VP); **C**: Controle com pirogalol. Barras representam o desvio padrão.

A avaliação da atividade antioxidante para as amostras de calos dos controles e dos tratamentos com UV-B revelou que estas não apresentavam alta capacidade de redução do DPPH<sup>\*</sup>(<50%), em relação ao controle positivo pirogalol (Fig. 10).



**Figura 10** - Percentual de redução do DPPH• em função de diferentes concentrações das amostras de calos de raízes. **Legendas** - **E7**: Extrato de calos 6 h (controle); **E8**: Extrato de calos 12 h (controle); **E9**: Extrato de calos 24 h (controle); **E10**: Extrato de calos 6 h (UV-B); **E11**: Extrato de calos 12 h (UV-B); **E12**: Extrato de calos 24 h (UV-B) **C**: Controle com pirogalol. Barras representam o desvio padrão.

## DISCUSSÃO

A espécie *P. morifolia* vem atraindo a atenção dos pesquisadores devido as suas características ornamentais e pela possibilidade de sua utilização em programas de melhoramento (Junqueira et al., 2005; Pires et al., 2011; Pires et al., 2012). Na literatura não foram encontrados trabalhos atribuindo propriedades medicinais à *P. morifolia* ou buscando a produção de seus metabólitos secundários in vitro. Portanto, no presente estudo foi realizada a prospecção fitoquímica nos extratos de calos de raízes, e nos extratos de folhas, caules e raízes de plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação e in vitro.

Em testes preliminares, explantes obtidos a partir de folhas de vitroplantas de *P. morifolia*, não foram capazes de formar calos quando inoculados em meio MS contendo 2,4-D combinado com diferentes citocininas (dados não mostrados). A formação de calos ocorreu em explantes radiculares submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D. Esta auxina é relatada por muitos pesquisadores como a mais indicada para a indução de calos tanto para monocotiledôneas quanto para dicotiledôneas (Pan et al., 2010). No entanto, um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas é responsável por promover a proliferação celular de calos (Skoog & Miller, 1957; Nordström et al., 2004).

A combinação de 2,4-D com 6-benzilamopurina tem sido amplamente utilizada na indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de *P. cincinnata* (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010, Rocha et al., 2012) e de *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011). Essa auxina também é eficiente na indução de calos friáveis em segmentos foliares de *P. suberosa* (Garcia et al., 2011). No entanto, a combinação de 2,4-D com cinetina não promoveu a formação de calos em embriões zigóticos de *P. morifolia* (Guzzo et al., 2004).

Os calos inoculados em meio com 2,4-D apresentavam crescimento lento, demorando em torno de 70 dias de incubação para atingirem 700 mg de massa fresca. A adição de cinetina ao meio de subcultivo permitiu o melhor crescimento dos calos e sua rápida multiplicação massal. As citocininas são reguladores de crescimento com capacidade de induzir a divisão celular em tecidos vegetais, sendo importantes na organogênese (Pernisová et al., 2009, Marhavý et al., 2011). Segundo Skoog & Miller (1957) a razão auxina/citocinina é determinante para o crescimento e morfogênese nas plantas. Desta maneira, a otimização da produção de calos requer o conhecimento das

melhores combinações, tipos, concentrações e níveis endógenos dos reguladores de crescimento.

Na literatura são encontrados vários trabalhos onde a combinação de 2,4-D e cinetina é utilizada para a indução e crescimento de calos em *Passiflora* spp. (Guzzo et al., 2004; Antognoni et al., 2007; Rasool et al., 2011). Entretanto, explantes radiculares de maracujá não são muito utilizados para a calogênese, apesar das raízes serem explantes muito responsivos in vitro (Lombardi et al., 2007).

A prospecção fitoquímica realizada por meio da técnica de CCD, utilizando a condições cromatográficas descritas anteriormente, permitiu uma boa separação e detecção da presença de metabólitos secundários em diferentes extratos. As classes de metabólitos secundários detectadas nos extratos etanólicos de folhas e raízes de plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação foram triterpenos, esteroides, saponinas e flavonoides. Contudo, nos extratos de caules de plantas obtidas na mesma condição de cultivo, foi detectada apenas a presença de flavonoides. Para as espécies de *Passiflora* os principais fitoconstituintes relatados são flavonoides, glicosídeos cianogênicos e alcaloides (Dhawan et al., 2004; Costa & Tupinambá, 2005; Patel, 2009), embora também tenha sido descrita a presença de saponinas, triterpenos (Yoshikawa et al., 2000a; Yoshikawa et al., 2000b; Reginatto et al., 2001, Birk et al., 2005), antocianinas (Kidoey et al., 1997) e outros constituintes (Dhawan et al., 2004). Apesar do uso popular de várias espécies de *Passiflora*, ainda existem poucos estudos, para as espécies do gênero, sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (Gosmann et al., 2011).

Os constituintes químicos majoritários e, frequentemente, identificados em espécies de *Passifloras* são os flavonoides C-glicosilados (Wohlmuth et al., 2010; Gosmann et al., 2011; Sakalem et al., 2012). No presente trabalho, os resultados da prospecção fitoquímica por CCD indicam a presença de isovitexina e isorientina nas folhas, caules e raízes de plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação e de vitroplantas. Extratos de folhas das espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata* têm sido mais investigados em trabalhos de fitoquímica (Zucolotto et al., 2011). Portanto, os resultados obtidos com *P. morifolia* poderão, futuramente, auxiliar na escolha do órgão vegetativo a ser utilizado em pesquisas que visem o isolamento e a caracterização de flavonoides nesta espécie.

A obtenção de metabólitos secundários por cultura de tecidos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, devido a possibilidade de produção desses metabólitos em larga escala, utilizando condições controladas (Antognoni et al., 2007; Hussain et

al., 2012). De acordo com os resultados do presente trabalho, triterpenos, esteroides, saponinas e flavonoides foram detectados em todos os órgãos analisados de vitroplantas juvenis, que foram cultivadas sob iluminação de lâmpadas LED. Além disso, foram observadas diferenças na composição fitoquímica de flavonoides para plantas de casa de vegetação e in vitro. Segundo Nhut et al. (2003), as lâmpadas de LED proporcionam maior atividade fotossintética nas plantas, pois os picos de emissão LED para o azul e vermelho coincidem com os picos de absorção das clorofilas *a* e *b*. De fato, observa-se que o crescimento e vigor de vitroplantas de *P. morifolia* são favorecidos sob iluminação LED. Porém, não está claro se a utilização desse tipo de lâmpada pode ter influenciado a produção de metabólitos secundários na espécie, sendo esta uma hipótese a ser estudada em trabalhos futuros.

Segundo Dicosmo & Misawa (1995), um dos maiores problemas na produção de metabólitos secundários por cultura de calos é a instabilidade da produção. Já está bem descrito na literatura que a luz UV-B pode estimular a produção de compostos fenólicos nas plantas (Ballaré et al., 2001; Casati & Walbot, 2003; Jaakola et al., 2004; Zhang et al., 2012). Antognoni et al. (2007) obtiveram aumento na produção dos flavonoides orientina, isovitexina e vitexina, quando as culturas de calos de folhas de *P. quadrangularis* foram submetidos diariamente à uma dose de exposição a luz ultravioleta-B (UV-B). No entanto, na maioria dos casos, a cultura de calos pode perder a capacidade de produzir metabólitos secundários (Iwase et al., 2005; Gaosheng & Jingming, 2012). Machado et al. (2010) relataram que os calos obtidos a partir de folhas de *P. alata* não produziram alcaloides  $\beta$ -carbólicos, nem mesmo quando as culturas foram tratadas com *L*-triptofano, um precursor desses metabólitos.

O objetivo da exposição dos calos de raízes de *P. morifolia* à luz UV-B era investigar se o tratamento seria capaz de aumentar os níveis de acumulação de flavonoides nestas culturas. Entretanto, nenhuma mancha com fluorescência característica de flavonoides foi visualizada nos perfis cromatográficos por CCD das amostras de calos, independente do tratamento com luz UV-B. Provavelmente, os calos de raízes não tinham a capacidade de produção de flavonoides ou, se tinham, ela pode ter sido perdida durante o processo de desdiferenciação celular na calogênese. Como observado nas figuras 5 e 6, as folhas de *P. morifolia* produzem flavonoides em maior quantidade do que raízes, assim, provavelmente a possibilidade de produção de tais moléculas pode ser maior em calos provenientes de folhas. Esforços estão sendo

concentrados para obter calos a partir de explantes foliares de *P. morifolia* e, para tanto, reguladores de crescimento em diferentes concentrações estão sendo testados.

É interessante observar que triterpenos e esteroides foram identificados no tratamento com 6 horas de UV-B. Recentemente, estudos têm demonstrado a participação da luz UV-B na modulação do metabolismo de terpenos (Dolzhenko et al., 2010; Gil et al., 2012). Porém não fica claro, qual o real efeito dos tratamentos com UV-B na indução ou aumento da produção de triterpenos em calos de *P. morifolia*, uma vez que a análise fitoquímica foi feita apenas em uma repetição de cada tratamento e a técnica de CLAE-FR utilizada não é específica para a detecção de terpenos. Esta hipótese poderá ser investigada em trabalhos futuros.

Os resultados de CLAE-FR indicaram que folhas e caules de *P. morifolia* cultivada em casa de vegetação produzem isovitexina em maior proporção, e orientina e isorientina em menor proporção. Em adição, outros picos, com espectros de absorção no UV característicos de flavonoides, foram identificados nos cromatogramas das amostras de plantas de casa de vegetação. Em concordância com nossos resultados, Avula et al. (2012) identificaram por CLAE em amostras de partes aéreas de *P. morifolia*, os flavonoides orientina, isorientina, vitexina e isovitexina, sendo este último presente em maior concentração na espécie. Os resultados indicam também a presença de orientina, isorientina e isovitexina nos diferentes órgãos de vitroplantas de *P. morifolia*. A possibilidade de produção de diferentes flavonoides em vitroplantas é uma característica importante, pois estas podem ser obtidas de forma rápida utilizando condições controladas de cultivo.

Nos calos de raízes não foi detectado a presença de flavonoides ou pico com espectro de absorção característico desta classe de moléculas. No entanto, conforme mostrado na prospecção fitoquímica por CCD, as raízes de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação e in vitro apresentaram manchas com fluorescência característica de flavonoides. Diferentemente do observado, Zucolotto et al., (2006) não encontraram flavonoides em raízes de *P. edulis* cultivadas em condições de campo. Portanto, a capacidade de produção de flavonoides em raízes não é característica de todas as espécies de *Passiflora*. Nossos resultados confirmam a hipótese de que há a necessidade da ocorrência de diferenciação celular para a produção de flavonoides em raízes de *P. morifolia*, embora esta seja pequena. Estes resultados são importantes, pois indicam que existe a possibilidade de produção de flavonoides e outros metabólitos secundários através do cultivo in vitro de raízes de *P. morifolia* em biorreatores.

Segundo Matkowski (2008), devido a enorme variabilidade de compostos antioxidantes e sua complexa relação estrutura/atividade, para a complementação dos estudos que visem a produção de antioxidantes *in vitro*, é necessário aliar técnicas de avaliação da atividade antioxidante dos extratos. Desde que foi descrito por Brand-Williams et al. (1995), o teste do DPPH<sup>•</sup> tem sido utilizado para a determinação da atividade antioxidante de extratos de diferentes espécies vegetais. Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH<sup>•</sup>, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura, permitindo a quantificação espectrofotométrica do processo (Duarte-Almeida et al., 2006). Antognoni et al. (2007) obtiveram maior atividade antioxidante em extratos de calos de *P. quadrangularis* quanto maior foi a concentração de flavonoides. Como já eram esperados, os resultados do presente trabalho indicaram que os extratos de diferentes órgãos de plantas e vitroplantas, que continham flavonoides, apresentaram maior capacidade antioxidante do que os extratos de calos.

É interessante observar que houve uma diferença com relação a capacidade de redução do DPPH<sup>•</sup> quando comparamos os mesmos órgãos de plantas em diferentes condições de cultivo. A maior atividade antioxidante foi obtida no extrato de caules de vitroplantas que como mostrado, anteriormente, por meio da prospecção fitoquímica por CCD, apresenta triterpenos, esteroides, saponinas e flavonoides. Os resultados sugerem que as vitroplantas de *P. morifolia* são fontes de metabólitos secundários, mostrando que o cultivo utilizando lâmpadas de LED pode ser um fator diferencial para a obtenção de metabólitos *in vitro*.

Neste estudo, foi utilizada uma abordagem biotecnológica combinada com ferramentas de cultura de tecidos. Apesar do resultado de indução da produção de flavonoides, em cultura de calos de raízes de *P. morifolia* não ter sido o esperado, este trabalho permitiu uma melhor compreensão de alguns fatores envolvidos na produção de metabólitos secundários *in vitro* como, por exemplo, a seleção do explante, a escolha de reguladores de crescimento, o cultivo empregando lâmpadas de LED e a influência da exposição à radiação ultravioleta UV-B. O trabalho realizado poderá orientar futuras pesquisas com esta espécie em áreas multidisciplinares, considerando que ainda existem poucos estudos neste campo.

## REFERÊNCIAS

- Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia* 78: 345-352.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5ed. Brasília, 2010. 1448p. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd_farmacopeia/index.htm). (Acesso, Fevereiro de 2013).
- Avula B, Wang YH, Rumalla C, Smillie T, Khan I (2012) Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids from aerial parts of *Passiflora* species and dietary supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. *Natural Product Communications* 7: 1177-1180.
- Ballaré CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Matthew TR, Caldwell MM, Sala OE, Scopel AL (2001) Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62: 67-77.
- Birk CD, Provensi G, Gosmann G (2005) TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28: 2285-2291.
- Borges RS, Scaranari C, Nicoli AM, Coelho RR (2005) Novas variedades: validação e transferência de tecnologia. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 617-640.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Casati P, Walbot V (2003) Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiology* 132: 1739-1754.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Epidemiology* 16: 357-363.

Costa AM, Tupinambá DD (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 475-506.

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

Dicosmo F, Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13: 425-453.

Dolzhenko Y, Berteza CM, Occhipinti A, Bossi S, Maffei ME (2010) UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100: 67-75.

Dornenburg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.

Duarte-Almeida JM, Santos RJD, Genovese MI, Lajolo FM (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH<sup>\*</sup>. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 446-452.

Ferreira, DF (2010) SISVAR: Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA.

Filho DW, Silva EL, Boveris A (2001) Flavonoides oxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes RA, Calixto JB (eds). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos. pp 317-334.

Fotie J (2008) Theantiprotozoan potential of flavonoids. *Pharmacognosy Reviews* 2: 6-19.

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

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

Gaosheng H, Jingming J (2012) Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. In: Leva A, Rinaldi LMR (eds) Recent advances in plant in vitro culture. Rijeka: InTech. pp 197-210.

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

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

Guzzo F, Ceoldo S, Andreetta F, Levi M (2004) In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola* 61: 108-113.

Harnafi H, Amrani S (2007) Flavonoids as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. *Pharmacognosy Reviews* 1: 193-202.

Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ, Saeed M (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 4: 10-20.

Iwase A, Aoyagi H, Ohme-Takagi M, Tanaka H (2005) Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 208-215.

Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A (2004) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218: 721-728.

Jaroszewski JW, Rasmussen AB, Rasmussen HB, Olsen CE, Jorgensen LB (1996) Biosynthesis of cyanohydrin glucosides from unnatural nitriles in intact tissue of *Passiflora morifolia* and *Turnera angustifolia*. *Phytochemistry* 42: 649-654.

Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MV (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp 559-586.

Kaur IP, Geetha T (2006) Screening methods for antioxidants: a review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 6: 305-312.

Kidoey L, Nygaard AM, Andersen OM, Pedersen AT, Aksnes SW, Kiremire BT (1997) Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *Journal of Food Composition and Analysis* 10: 49-54.

Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 239-247.

Machado MW, Neto CS, Salgado J, Zaffari G, Barison A, Campos FR, Corilo YE, Eberlin MN, Biavatti MW (2010) Search for alkaloids on callus culture of *Passiflora alata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 901-910.

Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances* 26: 548-560.

Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Parezová M, Petrásek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell* 21: 796-804.

Maneechai S, De-Eknamkul W, Umehara K, Noguchi H, Likhitwitayawuid K (2012) Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry* 81: 42-49.

Moreira CPS, Silva CG, Almeida VL (2012) Propriedades químicas e medicinais do maracujá. *Informe Agropecuário* 33: 7-16.

Mondin CA, Cervi AC, Moreira GRP (2011) Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 3-27.

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

Namdeo AG, Patil S, Fulzele DP (2002) Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress* 18: 159-162.

Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews* 1: 69-79.

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8039-8044.

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

Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae* 144: 42-47.

Pan Z, Zhu S, Guan R, Deng X (2010) Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 145-153.

Patel SS (2009) Morphology and pharmacology of *Passiflora edulis*: a review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3: 1-6.

Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová J, Friml J, Žímalová E, Hejátko J (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 3609-3614.

Paim Pinto DL, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva MLD, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 71-79.

- Paim Pinto DL, Almeida AMR, Rêgo MM, Silva ML, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 521-530.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2011) Photosynthetic characteristics of ornamental passion flowers grown under different light intensities. *Photosynthetica* 49: 593-602.
- Pires MV, Almeida AAF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2012) Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. *Acta Scientiarum* 34: 67-75.
- Pradhan R, Dandawate P, Vyas A, Padhye S, Biersack B, Schobert R, Ahmad A, Sarkar FH (2012) From body art to anticancer activities: perspectives on medicinal properties of Henna. In: Makris D, Zakyntinos E (eds) *Current Drug Targets*. Netherlands: Bentham Science Publishers B.V. pp 1777-1798.
- Rao SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Ramani S, Chelliah J (2007) UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC Plant Biology* 7: 1-17.
- Rasool SN, Jaheerunnisa S, Jayaveera KN, Kumar CS (2011) In vitro callus induction and in vivo antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. leaves. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 4: 1-10.
- Reginatto FH, Kauffmann C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP (2001) Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12: 32-36.
- Reis LB, Lemes MS, Passes ABL, PeixotoMLO, Pinto DLP, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738: 425-431.

- Rocha D, Vieira L, Tanaka F, Silva LC, Otoni W (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249: 747-758.
- Rodrigues FR, Almeida WAB (2010) Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos in vitro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12: 333-340.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposium of the Society for Experimental Biology* 11: 118-231.
- Sakalem ME, Negri G, Tabach R (2012) Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 1219-1232.
- Sánchez-Moreno C (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8: 121-137.
- Silva ML, Pinto DLP, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 47-54.
- Sharma P, Padh H, Shrivastava N (2013) Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences* 13: 62-75.
- Wagner H, Bladt S (2001) Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 384p.
- Weathers PJ, Towler MJ, Xu J (2010) Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1339-1351.
- Wohlmuth H, Penman KG, Pearson T, Lehmann RP (2010) Pharmacognosy and chemotypes of passionflower (*Passiflora incarnata* L.). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33: 1015-1018.

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

Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S (2000a) Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products* 63: 1229-1234.

Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S (2000b) New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products* 63: 1377-1380.

Zhang Z-Z, Li X-X, Chu Y-N, Zhang M-X, Wen Y-Q, Duan C-Q, Pan Q-H (2012) Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 74-83.

Zuanazzi JAS, Montanha JA (2004) Flavonoides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (eds) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS. pp 576-614.

Zucolotto SM, Palermo JA, Schenkel EP (2006) Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 25: 5-9

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP (2011) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* 23: 232-239.

## CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, no primeiro capítulo constatou-se que segmentos radiculares de vitroplantas de *P. morifolia* podem ser utilizados para indução de embriões somáticos quando inoculados em meio com 2,4-D em concentrações maiores ou iguais a 6,78  $\mu\text{M}$ . Nestas condições, as análises histológicas mostraram que as células do periciclo e de tecidos vasculares associados formaram zonas de proliferação que ao se desenvolverem promoveram o rompimento do córtex e da epiderme da raiz lateral gerando os embriões somáticos e calos embriogênicos. Em adição a confirmação histoquímica da embriogênese somática, a técnica de hibridização *in situ* é uma boa ferramenta de confirmação molecular do processo utilizando a expressão do gene marcador *SERK*.

Com relação aos estudos realizados no segundo capítulo, constatou-se que segmentos radiculares de vitroplantas de *P. morifolia* podem ser utilizados para formação de calos, sendo que maior resposta a calogênese pode ser obtida utilizando 2,4-D na concentração de 6,78  $\mu\text{M}$ . O melhor crescimento dos calos é alcançado adicionando ao meio de subcultivo cinetina na concentração de 2,32  $\mu\text{M}$ , e realizando a incubação no claro. O cultivo de vitroplantas sob lâmpadas de LED pode ser um fator diferencial para a produção de metabólitos secundários em *P. morifolia*, uma vez que calos de raízes não são produtores de flavonoides nem mesmo quando submetidos a diferentes tratamentos com luz UV-B. Plantas de *P. morifolia* cultivadas em casa de vegetação são fontes de importantes flavonoides C-glicosilados e vitroplantas também apresentam a capacidade de produzir tais flavonoides, sendo a maior concentração destas moléculas encontrada nas folhas. A maior capacidade antioxidante foi apresentada pelo caule de vitroplantas e a menor pelos calos obtidos a partir de raízes.

Os resultados do presente trabalho constituem informações importantes para o entendimento da embriogênese somática em raízes de *Passiflora*, subsidiando investigações relacionadas à análise da expressão do gene *SERK* durante o processo. Além disso, a espécie *P. morifolia* é apontada como fonte de importantes metabólitos secundários, existindo a possibilidade de produção destes metabólitos em condições controladas de cultivo *in vitro*, podendo subsidiar novos trabalhos na área.