

INDUÇÃO E CONTROLE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
*Passiflora edulis* Sims, CULTIVAR “UENF Rio Dourado”

**KALIANE ZAIRA CAMACHO MAXIMIANO DA CRUZ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

INDUÇÃO E CONTROLE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
*Passiflora edulis* Sims, CULTIVAR “UENF Rio Dourado”

**KALIANE ZAIRA CAMACHO MAXIMIANO DA CRUZ**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

063/2018

C957 Cruz, Kaliane Zaira Camacho Maximiano da.

Indução e controle da embriogênese somática em *Passiflora edulis Sims*, cultivar "UENF Rio Dourado" / Kaliane Zaira Camacho Maximiano da Cruz. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

62 f. : il.

Bibliografia: 36 – 47.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Vanildo Silveira.

1. Regeneração. 2. Polietilenoglicol. 3. Análise Histomorfológica. 4. Maracujá. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.425

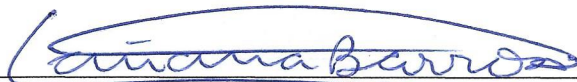
INDUÇÃO E CONTROLE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
*Passiflora edulis* Sims, CULTIVAR “UENF Rio Dourado”

**KALIANE ZAIRA CAMACHO MAXIMIANO DA CRUZ**

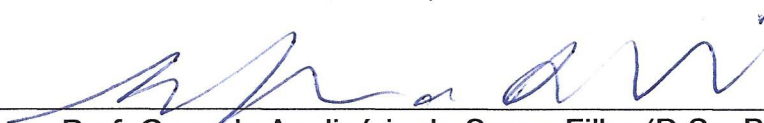
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018

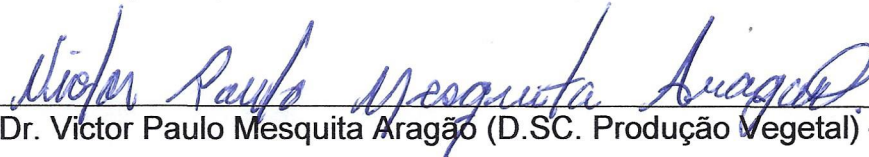
Comissão Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Tatiana Santos Barroso (D.Sc. Biociências e Biotecnologia) – SEEDUC/RJ



Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc. Biotecnologia) – UENF



Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc. Biotecnologia) – (UENF)  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vanildo Silveira, pela confiança, pela orientação, pelo apoio e pela paciência exercida nos dois anos de estudos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Claudete Santa Catarina, pela colaboração, pelos ensinamentos e pelos conselhos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pio Viana e aos doutorandos Moisés Ambrósio e Natan Cavalcante, do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal/CCTA, pela parceria em fornecer o material e o apoio ao Campo.

Aos meus pais, Lindomar e Sueli, por todo amor, apoio, carinho e confiança ao longo de minha vida. São os maiores inspiradores dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Maxuel e Maxiane, por estarem sempre ao meu lado e torcerem pelos meus sonhos.

À M.Sc. Nadia Botini, pela amizade, pelo companheirismo e pelo auxílio na realização das etapas dos experimentos desta pesquisa.

À Dra. Ellen de Moura Vale, pelo auxílio nos trabalhos de histologia realizados e pelos conselhos em prol deste trabalho.

A todos os amigos, docentes e técnicos do LBT, LBCT e Bioint, pelo companheirismo e pela parceria no dia a dia de trabalho nos laboratórios.

À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo profissionalismo e pela dedicação.

Ao Laboratório de Biotecnologia (LBT)/CBB/UENF e à Unidade de Biologia de Unidade Integrativa Bioint/UENF, pelo apoio e suporte na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT)/CBB/UENF, pelo suporte nas análises histomorfológicas.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

À FAPERJ e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos que viabilizaram direta e indiretamente a condução do projeto.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UENF, pela oportunidade de realização deste trabalho e por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1. Maracujazeiro .....	5
3.2. Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática.....	8
3.3. Embriogênese somática em <i>Passiflora</i> sp. ....	12
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
4.1. Material vegetal.....	15
4.2. Indução à embriogênese somática .....	16
4.3. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos .....	18
4.4. Análise estatística .....	19
<b>5. RESULTADOS</b> .....	20

5.1. Indução à embriogênese somática .....	20
5.2. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos .....	23
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
6.1. Indução à embriogênese somática .....	28
6.2. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos .....	30
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sementes do maracujá-azedo *P. edulis* Sims cv. UENF “Rio Dourado”. A) Semente com tegumento. B) Semente sem tegumento utilizada para a desinfestação. C) Embrião zigótico excisado a partir da semente. Barras: 0,2 mm..... 16
- Figura 2:** Padrão de indução e desenvolvimento da embriogênese somática na cultura de *P. edulis* cv. UENF “Rio Dourado”. A) Início da indução na região do eixo embrionário. B) Início da indução na região cotiledonar. C) Calo não-embriogênico. D) Calo embriogênico. E) Embrião no estágio globular no 20  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M BA. F) Germinação dos embriões zigótico submetidos ao meio controle. Barras: A, B, E: 0,5 mm. C, D, F: 0,2 mm.....21
- Figura 3:** Padrões de indução e desenvolvimento da embriogênese somática na cultura de *P. edulis* cv. UENF “Rio Dourado”. A) Calo não-embriogênico. B) Calo com porção embriogênica e não embriogênica encontrado nos tratamentos com 20, 40 e 80  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M BA. C) Estruturas organizadas semelhantes a embriões globulares na fase de multiplicação (setas). D) Embriões somáticos no estágio globular ao final da fase de multiplicação. Barras: A, B: 0,2 mm. C, D: 0,1 mm. .... 23
- Figura 4:** Embriões somáticos na maturação de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado”. A) Embrião globular. B) Embrião codiforme. C D) Embriões cotiledonares. Barras: 0,2 mm .....26

**Figura 5:** Aspectos gerais do estudo histomorfológico de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” no 2º experimento de maturação aos 28 dias de cultivo. A) Calo não-embriogênico. B) Calo embriogênico. C) Regiões com células organizadas e formação de pró-embriões (círculo vermelho) que precederam a formação de embriões no tratamento de maturação (PEG 6%). D) Anatomia do calo não-embriogênico (setas indicando ortocromatia). E) Anatomia do calo embriogênico (setas indicando as paredes metacromáticas). Barras: A, B: 0,2 mm. C, D, E: 100, 50, 20 µm, respectivamente.....27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Produção e rendimento de maracujá no Brasil, no período de 1980 a 2015. ....	6
<b>Tabela 2:</b> Tratamento de indução à embriogênese somática – 1º Experimento....	17
<b>Tabela 3:</b> Tratamento de indução à embriogênese somática – 2º Experimento....	17
<b>Tabela 4:</b> Tratamentos utilizados no 1º experimento de maturação com o uso de carvão ativado (CA) em diferentes concentrações.....	18
<b>Tabela 5:</b> Tratamentos utilizados no 2º experimento de maturação com o uso de carvão ativado (CA) e polietilenoglicol (PEG). ....	19
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de indução dos calos por tratamento.....	21
<b>Tabela 7:</b> Porcentagem de indução dos calos embriogênicos e não-embriogênicos por tratamento.....	22
<b>Tabela 8:</b> Taxa de maturação (média de embriões) do 1º experimento aos 28 dias de cultivo.....	24
<b>Tabela 9:</b> Número médio de embriões (embriões/placa) nos estádios globular e cotiledonar aos 28 dias e 56 dias em diferentes tratamentos de maturação no 2º experimento. ....	24
<b>Tabela 10:</b> Incremento em matéria fresca inicial e final e total do aumento da matéria fresca aos 28 dias de maturação. ....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2,4-D:** ácido.2,4-diclorofenóxiacético

**ABA:** ácido abscísico

**ANOVA:** análise de variância

**BA:** 6-benziladenina

**CV:** cultivar

**MF:** matéria fresca

**PEG:** polietilenoglicol

## RESUMO

CRUZ, Kaliane Zaira Camacho Maximiano da; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2018; Indução e controle da embriogênese somática em *Passiflora edulis* Sims, cultivar “UENF Rio Dourado”. Orientador: Dr. Vanildo Silveira; Conselheiros: Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho e Dr.<sup>a</sup>. Virginia Silva Carvalho.

Este estudo teve como objetivo induzir a embriogênese somática e caracterizar histomorfologicamente calos embriogênicos e não-embriogênicos de *Passiflora edulis* Sims, cv. “UENF Rio Dourado”. Para a indução das culturas, embriões zigóticos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar e inoculados em meio de cultura MS com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 20, 40 e 80 µM) isolado e/ou combinado com 5µM de 6-benziladenina (BA). Para a maturação, três colônias de 300 mg de matéria fresca foram inoculadas em condições de inoculação descritas anteriormente (sem regulador de crescimento), suplementadas com diferentes concentrações de carvão ativado (CA) isolado e/ou combinado com 6% de polietilenoglicol (PEG 6%). As concentrações de carvão foram 0, 1,0; 1,5 e 3,0 g L<sup>-1</sup> de CA e a concentração de CA combinada com PEG foi de 1,5 g L<sup>-1</sup> CA + PEG 6%. Amostras de calos embriogênicos e não-embriogênicos dos tratamentos Controle e PEG 6% foram utilizadas para análise histomorfológica aos 28 dias de maturação. O tratamento que apresentou a maior taxa de indução foi o da

combinação de 20  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA com 60% de calos embriogênicos. Este tratamento não diferiu dos tratamentos 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA, mas ele apresentou, ao final da fase de multiplicação, embriões no estágio globular de desenvolvimento e é o tratamento que apresenta a menor das concentrações da auxina 2,4-D. O tratamento que possibilitou a maior média de embriões no estágio cotiledonar foi o PEG 6%, com um número médio de 14 embriões por placa aos 56 dias de cultivo. O PEG foi importante para o processo de maturação dos embriões somáticos de *P. edulis* cv. "UENF Rio Dourado" sendo este o primeiro relato da utilização de PEG na embriogênese somática de *Passiflora* sp. Após o período de maturação, os embriões cotiledonares foram submetidos ao processo de germinação para a sua regeneração em plântulas. Na análise histomorfológica, foi possível observar as diferenças dos calos embriogênicos e não-embriogênicos obtidos nos tratamentos de maturação aos 28 dias de cultivo, tendo a reação ortocromática, para os calos não-embriogênicos, e metacromática, para os calos embriogênicos (coloração violácea nas paredes celulares).

Palavras-chave: Regeneração; Polietilenoglicol; Análise Histomorfológica.

## ABSTRACT

CRUZ, Kaliane Zaira Camacho Maximiano da; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2018; Somatic embryogenesis induction and control in *Passiflora edulis* Sims cv. "UENF Rio Dourado" Advisor: Dr. Vanildo Silveira; Counselors: Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho and Dr.<sup>a</sup>. Virginia Silva Carvalho.

This study aimed at inducing somatic embryogenesis and to histomorphologically characterize embryogenic and non-embryogenic callus of *Passiflora edulis* Sims, cv. "UENF Rio Dourado". For culture induction, zygotic disinfested in a laminar flux chamber and inoculated in MS culture medium with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel®, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, and supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0, 20, 40, and 80 µM) isolated and/or combined with 5 µM 6-benzyladenine (BA). For maturation, three colonies of 300 mg of fresh matter were inoculated under the same conditions described previously (plant growth regulator-free), supplemented with different concentrations of activated charcoal (AC) isolated and/or combined with 6% polyethylene glycol (PEG 6%). Activated charcoal concentrations were 0, 1.0, 1.5, and 3.0 g L<sup>-1</sup> and the concentration of AC combined with PEG was 1.5 g L<sup>-1</sup> CA + 6% PEG. Embryogenic and non-embryogenic callus samples from the Control and PEG 6% treatments were used for histomorphological analysis at 28 days of maturation. The treatment presenting the highest induction rate was the combination of 20 µM 2,4-D + 5 µM BA with 60% of embryogenic calli. This

treatment did not differ from the treatments 40 and 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA, but showed, at the end of the multiplication stage, embryos at the globular stage of development, and it was the treatment using the lowest concentration of the auxin 2,4-D. The best treatment regarding the highest number of somatic embryos in the cotyledonary stage was PEG 6% with an average of 14 embryos per plate at 56 days of culture. PEG was important for the maturation process of the somatic embryos of *P. edulis* cv. "UENF Rio Dourado". After the maturation period, the cotyledonary embryos were submitted to the germination process for plant regeneration (data under analysis). In the histomorphological analysis, differences were observed between embryogenic and non-embryogenic callus obtained in the maturation treatments at 28 days of culture, with the orthochromatic reaction for the non-embryogenic callus and metachromatic reaction for embryogenic callus (violet coloration on the cell walls).

Keywords: Regeneration; Polyethylene Glycol; Histomorphological Analysis.



## 1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro (*Passiflora* sp.) é o gênero mais comum da família Passifloraceae, apresentando uma alta importância econômica (Ulmer et al., 2004; Pérez et al., 2007). No mercado comercial, as espécies de maracujazeiro são comumente utilizadas por seus frutos e derivados, também por suas propriedades medicinais e plantas ornamentais (de Melo e Guerra, 2003; Pacheco et al., 2016).

O uso do maracujazeiro como planta ornamental se deve à diversidade e ao exotismo de suas folhas, flores e frutas; embora seu valor ornamental ainda seja pouco explorado no Brasil, é altamente valioso nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (Abreu et al., 2009).

Dentre as espécies de maracujazeiro cultivadas, a *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro-azedo) é a que apresenta maior apreciação no mercado nacional (Meletti, 2011; Cerqueira-Silva et al., 2014), com aproximadamente 95% de predominância nos pomares brasileiros, devido à qualidade superior da espécie em relação à produtividade, à fitossanidade, ao vigor híbrido e ao rendimento da polpa utilizada na fabricação de sucos (Meletti e Bruckner, 2001; Vieira et al., 2014; Viana et al., 2016).

O método de propagação convencional do maracujazeiro é via seminífera, no entanto, outras formas de propagação assexuada também têm sido utilizadas como a enxertia, a estaquia e a cultura de tecidos vegetais (Ferreira et al., 2001; de Sousa et al., 2010).

O maracujazeiro é uma planta alógama por excelência. Devido à sua morfologia floral, a alogamia também é reforçada pela presença da autoincompatibilidade do tipo esporofítica, e estas características são responsáveis pela grande variabilidade genética do gênero (Bruckner et al., 1995; Meletti e Bruckner, 2001).

Devido a essa ampla variabilidade genética do maracujazeiro, se faz necessário recorrer aos diferentes métodos de propagação assexuada para a obtenção de materiais mais homogêneos, para formação de pomares uniformes quanto à produção e à qualidade de frutos, e fitossanidade, sendo este último um dos fatores que afetam drasticamente a produção comercial do maracujazeiro (Salomão et al., 2002; Yang e Zhang, 2010).

Desta forma, métodos de cultura de tecidos vegetais vêm auxiliando as pesquisas para o melhoramento do maracujazeiro, o que poderia possibilitar a propagação em larga escala de cultivares criadas a partir da seleção de genótipos superiores, com características desejáveis comercialmente, além de produzir plantas com qualidade fitossanitária, livre de doenças e patógenos (Zerbini et al., 2008).

A embriogênese somática é um dos métodos da cultura de tecidos vegetais mais eficientes para a regeneração *in vitro* de plantas, baseado na totipotência celular, e análogo ao da embriogênese zigótica, na qual uma única célula ou um pequeno grupo de células somáticas são precursores da formação de um embrião somático (Tautorus et al., 1991).

O método de embriogênese somática tem como vantagens a produção de embriões somáticos uniformes e com pureza genética; a obtenção de altas taxas de multiplicação; a possibilidade de automatização do sistema de trabalho através do uso de biorreatores; além da utilização como ferramenta integrada aos programas de melhoramento genético quando associada à criopreservação e à engenharia genética (Guerra et al., 1999; Steiner et al., 2008).

Embora a embriogênese somática apresente ótimo potencial, existem algumas limitações como o desenvolvimento não sincronizado dos embriões somáticos o que leva à formação de anomalias, e a desestabilidade das linhas celulares sobre um curto prazo de tempo, não havendo a produção de embriões por longos períodos (Zimmerman, 1993; Zegzouti et al., 2001; Deo et al., 2010).

O processo da embriogênese somática envolve a diferenciação de células somáticas, que adquirem capacidade de responder a sinais e ativam genes capazes de gerar células embriogênicas (Quiroz-Figueroa et al., 2002). Para que ocorra a formação das células embriogênicas, é preciso que o explante usado tenha potencial para expressar a totipotencialidade; as células devem ser competentes para responder a sinais exógenos, serem induzidas por sinais específicos (geralmente reguladores de crescimento vegetais); e serem comprometidas com a via embriogênica (Elhiti et al., 2013).

O compromisso com a via embriogênica requer a desdiferenciação celular, pois as células maduras do explante perdem seu destino específico e se tornam meristemáticas (Elhiti, 2010). Dessa forma, essas “novas” células meristemáticas podem então iniciar um novo destino e regenerar embriões dependendo das condições fornecidas (Elhiti et al., 2013).

Os reguladores de crescimento vegetais, como auxinas e citocininas, são agentes indutores fundamentais na embriogênese somática, influenciando na indução das culturas para o processo de desdiferenciação celular (Elhiti et al., 2013).

O processo de embriogênese somática pode ser induzido em uma ampla gama de explantes, mais comumente tratando-os com reguladores de crescimento vegetais, geralmente a auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e/ou tratamentos de estresse abiótico (Fehér, 2015; Horstman et al., 2017).

O mecanismo subjacente à indução à embriogênese somática pela auxina e estresse ainda não é conhecido, mas ambos os tratamentos induzem a biossíntese de auxinas endógenas, o que é considerado um passo inicial importante na troca para o crescimento totipotente (Fehér, 2015; Horstman et al., 2017).

Apenas três estudos sobre embriogênese somática em *P. edulis* foram realizados fazendo o uso de auxinas e citocininas, com *P. edulis* das populações Araguari “FB100”, “FB200” e “FB300” (Pinto et al., 2011), *P. edulis* população Araguari “FB300” (da Silva et al., 2015) e *P. edulis* população Araguari “FB100” (Rocha et al., 2015a). Novos protocolos aplicados a outras espécies da família Passifloraceae são necessários para o aumento da eficiência e reprodutibilidade da regeneração via embriogênese somática em *Passiflora* sp. (Otoni et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Estudar o processo de indução e controle da embriogênese somática em *P. edulis* Sims cv. “UENF Rio Dourado”, visando a elaboração de um protocolo de regeneração eficiente para a espécie.

### 2.2. Objetivos específicos

**a)** Desenvolver um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *P. edulis* Sims cv. “UENF Rio Dourado”.

**b)** Estabelecer as melhores condições para a maturação dos embriões somáticos obtidos.

**c)** Observar as diferenças histomorfológicas de calos embriogênicos e não-embriogênicos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Maracujazeiro

A família Passifloraceae é originária da África, porém é na América Central onde ocorre a maior diversidade de espécies (Muschner et al., 2012). A família é composta por aproximadamente 530 espécies e 400 híbridos artificiais (Ulmer et al., 2004). Do total de espécies, 153 são nativas do Brasil (Flora do Brasil, 2017) e aproximadamente 130 espécies apresentam potencial econômico devido aos seus frutos (Carmo et al., 2017).

Em geral, as plantas de maracujazeiro são do tipo trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com gavinhas axilares, hermafroditas, dioicas ou andromonoicas. Possuem folhas alternas, com estípulas presentes, às vezes decíduas, ou ausentes, pecíolo com ou sem nectários, e lâmina simples, lobada a inteira, ou composta, com ou sem ocelos. As inflorescências são axilares, cimosas ou racemosas, ou reduzidas a 1-2 flores por nó, com flores períginas ou hipóginas, actinomorfas ou zigomorfas. O fruto é do tipo baga ou cápsula 3-4 valvar. As sementes são comprimidas, ariladas, testa óssea, com embrião grande, endosperma oleaginoso e nuclear (Bernacci et al., 2003).

As plantas de maracujazeiro são consideradas alógamas, com uma ampla variabilidade genética devido principalmente às características florais e aos grãos

de pólen que são pesados e pegajosos, dificultando a polinização anemófila (polinização pelo vento) e levando à autoincompatibilidade (Bruckner et al., 1995).

Apresentam um conjunto cromossômico diploide ( $2n=2x=18$ ) para as principais espécies, tais como *P. edulis* e *P. alata* (Storey, 1950; Snow e MacDougal, 1993); no entanto, também é possível encontrar algumas espécies tetraploides ( $2n=24$ ), hexaploides ( $2n=36$ ) e octaploides ( $2n=72$ ) (Martin e Nakasone, 1970; Snow e MacDougal, 1993; de Melo et al., 2001).

No Brasil, as espécies estão distribuídas entre os gêneros *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L, sendo este último gênero o principal e o mais representativo no País, com 145 espécies descritas (Flora do Brasil, 2017). O seu cultivo tornou-se expressivo na década de 90, devido aos investimentos em áreas de produção (Meletti, 2011), bem como representa uma alternativa agrícola viável para pequenas propriedades por fornecer um rápido retorno econômico (Meletti, 2011).

Com a valorização no preço dos frutos de maracujá, o mercado que antes era voltado estritamente para a industrialização também aderiu ao de consumo *in natura* (Ferraz e Lot, 2007). No fim da década de 90, a cultura do maracujazeiro apresentou um aumento significativo na produção, seguido por um declínio nas décadas seguintes (Tabela 1). Esse comportamento ocorreu devido aos grandes prejuízos que alguns estados produtores, como São Paulo, sofreram por conta da elevada incidência de viroses (Meletti, 2011).

**Tabela 1:** Produção e rendimento de maracujá no Brasil no período de 1980-2015.

Ano	Área Colhida (ha)	Produção até 2000 (frutos/ha) a partir 2001 (t)	Rendimento até 2000 (frutos/ha) a partir de 2001 (t/ha)
1980	6.590	73.230	11.112
1985	9.068	51.108	5.636
1990	25.329	2.643.634	104.372
1995	38.522	2.382.243	87.800
2000	33.428	2.762.808	82.650
2005	35.820	479.813	13.40
2010	62.177	922.334	14.83
2015	50.837	694.539	13.66

**Fonte:** IBGE 2016 – Produção agrícola municipal 2015. Consultado em 27/09/2016.

Em decorrência do declínio da produção de frutos, em 1999, o Instituto Agrônomo lançou e recomendou aos produtores a utilização de sementes de cultivares híbridas, e isto influenciou no surgimento de várias agroindústrias de sucos em diversos estados do País (Meletti e Maia, 1999).

Com o passar dos anos e com o aumento dos investimentos no Brasil, foi possível observar, no ano de 2016, uma produção de 703.489 toneladas com um rendimento de 14,10 toneladas/hectare, sendo que a concentração de produção foi nos estados da Bahia (342.780 toneladas), Ceará (98.122 toneladas) e Minas Gerais (39.237 toneladas). Nesse mesmo ano, o Estado do Rio de Janeiro esteve no décimo sétimo lugar com uma produção de 5.956 toneladas (IBGE, 2016).

O consumo de *P. edulis* é popular devido à qualidade de seu fruto, ao alto vigor híbrido e à produtividade em comparação a outras espécies de *Passiflora* (Jesus et al., 2017).

O melhoramento genético do maracujazeiro teve seu início nos anos 90, baseando-se na estratégia de seleção massal (Faleiro et al., 2005). Este método consiste na escolha de um grande número de indivíduos com características fenotípicas semelhantes, que são colhidos em conjunto para constituir a geração seguinte (Borém e Fritsche-Neto, 2014).

A seleção massal é um dos métodos mais antigos de melhoramento de plantas. A preservação das plantas mais atraentes ou produtivas pelos primeiros agricultores resultou no aumento da frequência de alelos favoráveis (Borém e Fritsche-Neto, 2014). Assim, a principal finalidade deste método de seleção é o aumento da média geral da população por meio da escolha dos melhores fenótipos (Borém e Fritsche-Neto, 2014).

A eficiência da seleção massal enquadra-se nas características que são de fácil mensuração e que possuem considerável herdabilidade (Faleiro et al., 2005). No maracujazeiro, essas características estão relacionadas ao formato do fruto, ao teor de sólidos solúveis totais, à produtividade e ao vigor vegetativo.

A partir de então, grupos de pesquisa voltados para o melhoramento do maracujazeiro foram surgindo, como exemplo, o grupo de melhoramento de maracujazeiro-azedo da Universidade Estadual do Norte Fluminense–Darcy Ribeiro (UENF).

O grupo de melhoramento da UENF iniciou em 1998 com a coleta de genótipos de *P. edulis* Sims em três distintas regiões produtoras do Estado do Rio

de Janeiro (Viana et al., 2003). Inicialmente, foram realizados delineamentos genéticos apropriados para a obtenção de progênies, e, com base nos resultados, optou-se pela elaboração de um grupo de seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro-azedo (de Moraes Silva et al., 2009).

A seleção recorrente é um dos métodos de melhoramento que se destaca pela sua finalidade, que é aumentar a frequência dos alelos favoráveis nas populações, mantendo seu desempenho médio na expressão do caráter e a variabilidade necessária no decorrer dos ciclos de seleção subsequentes (Heinz et al., 2012).

Após anos de estudos com a espécie *P. edulis*, no ano de 2015, foi registrada pela UENF, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Fornecimento (MAPA), a cv. “UENF Rio Dourado”, registrada pelo Serviço Nacional de Proteção ao Cultivar (SNPC).

A cv. “UENF Rio Dourado” é caracterizada pela presença de frutos grandes (aproximadamente 76 mm) com um conteúdo de sólidos solúveis de 13,50 ° Brix e pH de 3,20, e, em termos de produtividade, apresenta um valor médio de 250 frutos, um rendimento de 25 toneladas/hectare e um peso de aproximadamente 175 gramas por fruto (Viana et al., 2016).

### **3.2. Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática**

A cultura de tecidos vegetais, ou a cultura asséptica de células, tecidos e órgãos, é uma ferramenta importante para estudos básicos e aplicados, bem como para aplicação comercial (Thorpe, 1990). Sua origem deve-se aos estudos de Haberlandt, em 1902, que sugeriu a possibilidade do cultivo artificial de embriões de células vegetais, levando-o a introduzir o conceito de totipotência (Krikorian e Berquam, 1969), que é a capacidade de células vivas, que possuem um conjunto de cromossomos normais, regenerarem uma planta completa (Thorpe, 1990). Durante o período compreendido entre 1940 e 1960, estudos avançados acerca da cultura de tecidos foram realizados, desde a erradicação de vírus, a partir da cultura de meristema, da obtenção de células isoladas e das culturas em suspensão, até a obtenção de células a partir de culturas



embrionárias. Nesse período, surgiram a maioria das técnicas utilizadas até os dias atuais (Thorpe, 1990, 2007).

Em 1990, foi observada uma expansão contínua na aplicação da cultura de tecidos para um número crescente de plantas. Esta técnica foi utilizada no cultivo de cereais, gramíneas, leguminosas, frutas tropicais, oleaginosas, espécies florestais e ornamentais (Thorpe, 2007). A cultura de tecidos vegetais também permitiu a melhor compreensão sobre o desenvolvimento vegetal, a partir de estudos bioquímicos, citogenéticos e moleculares, na descoberta de substâncias e enzimas de interesse, que geraram outras demandas de pesquisa, assim como propiciou a utilização da técnica para obtenção de plantas geneticamente transformadas (Thorpe, 2007).

O emprego de técnicas da cultura de tecidos no maracujazeiro envolve micropropagação, estudos fisiológicos, protoplastos e hibridização somática, transformação genética, ginogênese e androgênese, conservação *in vitro* e seleção *in vitro* para resistências a doenças (Otoni et al., 2013).

A embriogênese somática é considerada uma poderosa ferramenta utilizada na cultura de tecidos vegetais (Campos et al., 2017) como uma alternativa para a propagação massal, pois permite a formação de múltiplos embriões geneticamente idênticos, evitando a espera para a seguinte estação reprodutiva. Mostra-se também como um novo modelo de sistema nos métodos agrícolas tradicionais (Smertenko e Bozhkov, 2014; Kumar e Van Staden, 2017) e para estudos bioquímicos, moleculares, morfológicos e fisiológicos (Castro et al., 2010).

É um processo de desenvolvimento pelo qual uma única célula somática, ou um grupo de células somáticas, se desenvolve e se diferencia em embriões somáticos sob condições apropriadas de cultivo *in vitro* (Verdeil et al., 2007; Yang e Zhang, 2010; Guan et al., 2016).

Esses embriões somáticos passam pelos estádios de desenvolvimento similar aos da embriogênese zigótica, sendo os estádios globular, torpedo, codiforme e cotiledonar, onde posteriormente se desenvolvem em plantas inteiras (Zimmerman, 1993; Yang e Zhang, 2010).

A embriogênese somática foi inicialmente observada em 1958 por Stewart e colaboradores e Reinert (George et al., 2008). Nesses trabalhos clássicos, os

autores observaram o desenvolvimento de embriões somáticos em suspensões celulares, que foram induzidas a partir de tecidos de raiz de cenoura (Vasil, 2008).

A embriogênese somática pode se tornar uma rotina de micropropagação amplamente utilizada (Vasil, 1994) e vem alcançando um número crescente de estudos em diversas espécies de plantas (Vasil, 1994; de Faria et al., 2003; George et al., 2008) principalmente devido à escolha de explantes, aos meios de cultura e às condições de ambiente apropriadas (George et al., 2008).

A embriogênese somática pode ser dividida em quatro fases e/ou etapas: (A) indução em meios suplementados com reguladores de crescimento como auxinas e citocininas; (B) multiplicação em meio contendo auxinas em baixas concentrações; (C) maturação na ausência de reguladores de crescimento e/ou na presença de ácido abscísico (ABA) e agentes osmóticos; e (D) germinação em meio de cultura isento de reguladores de crescimento (Guerra et al., 1999).

A fase de indução pode ser alcançada por um tecido somático em condições específicas de cultura (Guerra et al., 2000) por meio de estímulos físicos (estresses) ou químicos (reguladores de crescimento) (Verdeil et al., 2007).

Um dos estímulos mais documentados na literatura para a indução é o uso do regulador de crescimento vegetal 2,4-D, uma auxina sintética (Dudits et al., 1991; Thorpe e Stasolla, 2001; Fehér et al., 2003). Todos os estímulos submetidos à célula no processo de indução podem promover a reprogramação gênica necessária para que células somáticas tornem-se células embriogênicas (Verdeil et al., 2007).

Outros reguladores de crescimento, como a 6-benziladenina (BA), vêm sendo utilizados para a regeneração em embriogênese somática, em baixas taxas ou combinados com outras auxinas em diversas espécies como as gramíneas (Chaudhury e Qu, 2000).

Mudanças de caráter epigenético como metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e micro RNA (miRNA) regulam o nível de expressão gênica durante a embriogênese somática (Wang e Wang, 2012; Smertenko e Bozhkov, 2014). A exposição à auxina aumenta os níveis de metilação do DNA, levando à divisão e à desdiferenciação celular (von Aderkas e Bonga, 2000).

Portanto, as mudanças dinâmicas na estrutura da cromatina por metilação do DNA na presença de 2,4-D conduzem à reprogramação gênica em células

somáticas e são expressas em centenas de genes especificamente necessários para adquirir a competência embriogênica (Karami e Saidi, 2010).

Os genes Somatic Embryogenesis receptor Kinase (SERK) são genes considerados como marcadores moleculares de células, que apresentam competência embriogênica (Schmidt et al., 1997; Rocha et al., 2015b).

Esses genes pertencem a uma superfamília bem-conservada de receptor tipo quinase de repetição rica em leucina (LRRRLK) e são responsáveis por uma variedade de processos de transdução de sinal em plantas (Baudino et al., 2001).

A expressão SERK é considerada como um marcador molecular na embriogênese somática por estar relacionado com a aquisição da competência celular, envolvido no início da formação de massas pró-embriogênicas até a formação dos embriões no estágio globular (Schmidt et al., 1997).

Dois mecanismos são importantes para a formação das células embriogênicas: divisão assimétrica e controle da expansão celular (de Jong et al., 1993). A divisão assimétrica é promovida pelos reguladores de crescimento, que alteram a polaridade por interferência no gradiente de pH ou o campo elétrico em torno das células (Smith e Krikorian, 1990); e a capacidade de controle da expansão celular está associada a polissacarídeos da parede celular em relação a enzimas hidrolíticas (de Jong et al., 1993; von Arnold et al., 2002). Após a formação dos calos embriogênicos, estes continuam a proliferar, formando massas pró-embriogênicas (Nomura e Komamine, 1985).

Na fase de multiplicação ou proliferação, o calo embriogênico é mantido em um meio de cultura semelhante ao usado na indução, e o pH é essencial para manter as culturas nesta fase (von Arnold et al., 2002), pois o pH baixo (ácido) é de alguma forma prejudicial para a produção inicial dos pró-embriões (Smith e Krikorian, 1990).

As culturas embriogênicas de algumas espécies e/ou genótipos podem ser subcultivadas por um longo período, mantendo o seu potencial embriogênico, porém a ocorrência de variação somaclonal aumenta com o cultivo prolongado. Dessa forma, as culturas embriogênicas não devem ultrapassar o período de seis meses de cultivo, sendo que, a partir do estabelecimento das células embriogênicas, é possível criopreservá-las para estudos futuros (von Arnold et al., 2002).

A transição de massas pró-embriogênicas a embriões representa um passo importante, pois é uma fase de ligação entre a proliferação e a organização do desenvolvimento embrionário (von Arnold et al., 2002). Após essa transição, ocorre a fase de maturação, que é marcada pelas alterações morfológicas e bioquímicas, com a expansão dos órgãos de armazenamento e os cotilédones. Concomitantemente, ocorre a repressão da germinação e a aquisição de tolerância à dessecação (Thomas, 1993). O período da maturação e a qualidade dos embriões somáticos são fatores limitantes para que ocorra a conversão dos embriões somáticos em plântulas (Guan et al., 2016).

As substâncias mais usadas para promover a maturação de embriões somáticos são o ABA, agentes osmóticos como o polietilenoglicol (PEG), carboidratos e carvão ativado (Thorpe, 1990; Pan e Van Staden, 1998; von Arnold et al., 2002; Lakshmanan et al., 2005). Nesta fase, é importante que o agente osmótico seja capaz de influenciar no desenvolvimento posterior dos embriões somáticos, possibilitando que a dessecação não afete o sucesso da germinação do embrião (von Arnold et al., 2002).

O ABA é um agente importante para o estímulo à maturação, provocando mudanças morfológicas no padrão de expressão gênica e no metabolismo de substâncias de reserva (Salajova et al., 1999), o que leva ao desenvolvimento normal dos embriões somáticos e à sua conversão em plântula em várias espécies (Stasolla e Yeung, 2003).

O PEG é um agente osmótico não plasmolizante, que apresenta alta densidade e não penetra nas células vegetais (Svobodová et al., 1999). Em suma, a adição no meio de cultura reduz a disponibilidade de água, simulando as condições de desenvolvimento do embrião zigótico, que promove a diferenciação celular (Stasolla e Yeung, 2003).

### **3.3. Embriogênese somática em *Passiflora* sp.**

O primeiro relato sobre a indução da embriogênese somática no gênero *Passiflora* sp. foi por meio do estabelecimento de suspensões celulares derivadas de explantes foliares de *Passiflora giberti* N.E Brown suplementados com picloram

(Otoni et al., 1995). Essas suspensões celulares obtidas foram utilizadas para estabelecer um protocolo de regeneração a partir de protoplastos isolados (Otoni et al., 1995; Anthony et al., 1999).

Um protocolo reproduzível para *P. cincinnata* Masters foi obtido a partir do uso de embriões zigóticos com a utilização de combinações de 2,4-D e BA, obtendo-se a formação de embriões somáticos até a regeneração em plantas (Silva et al., 2009).

Outros trabalhos empregando o protocolo de (Silva et al., 2009) foram realizados com diferentes intuitos, mostrando evidências histoquímicas e histocitológicas de *P. cincinnata* (Rocha et al., 2012), estudo de comparação das respostas morfogênicas em diferentes espécies de *Passiflora* sp. (*P. edulis* população Araguari “FB100”, *P. alata*, *P. crenata*, *P. foetida*, *P. giberti* (Rosa et al., 2014) e estudos para a obtenção de embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento até a regeneração em plantas de *P. miniata* e *P. speciosa* (Ferreira et al., 2015).

Para o estudo de embriogênese somática da espécie *P. edulis*, poucos trabalhos foram encontrados na literatura. Ao propor protocolo de regeneração, embriões zigóticos de três populações de Araguari “FB100”, “FB200” e “FB300” foram submetidos a altas concentrações de 2,4-D combinado com 6-benziladenina (BA) e obtiveram a indução em embriões somáticos, no entanto, não houve a regeneração em plantas (Pinto et al., 2011).

Outra proposta foi usar embriões zigóticos da população “FB 300” e submetê-los a diferentes concentrações de Picloram, 6-benzilaminopurina (BAP) e Thidiazuron (TDZ), o que possibilitou a indução de embriões somáticos até o estágio globular. Posteriormente, os autores caracterizaram a evolução histoquímica e análise histomorfológica nesse estágio. Observaram a formação de estruturas arredondas e organizadas, citoplasma denso e alta porção nuclear apoiando a presença de embriões globulares. Ao mesmo tempo, durante a evolução histoquímica, puderam observar que compostos proteicos de reserva são utilizados para a formação desses embriões globulares (da Silva et al., 2015).

A análise histomorfológica é uma ferramenta de importante influência na otimização e validação de protocolos de organogênese e embriogênese somática em *Passiflora* sp. (Otoni et al., 2013). Para uma melhor compreensão dos aspectos estruturais envolvidos em culturas embriogênicas, estudos citológicos

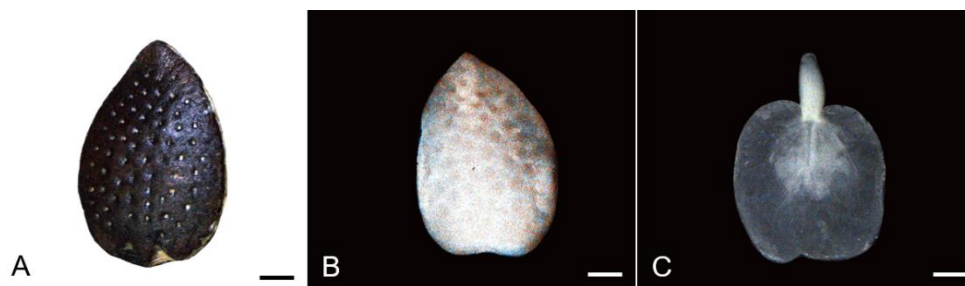
são realizados com diversas finalidades para mostrar as diferenças nas organizações celulares e os padrões que compreendem essa via de regeneração em variadas espécies de plantas (Verdeil et al., 2007; Rocha et al., 2012; Silveira et al., 2013; Vale et al., 2014; Steiner et al., 2016).

Calos embriogênicos de *S. officinarum* são formados por agrupamentos pequenos e isodiamétricos de células, que contêm núcleos proeminentes e citoplasma denso, sendo estes aglomerados estruturas redondas e delimitadas por uma camada de células organizadas. Em contraste, calos não-embriogênicos apresentam aspecto translúcido com células grandes, altamente vacuoladas, alongadas e dispersas, as quais não formam estruturas organizadas como as observadas em calos embriogênicos (Silveira et al., 2013).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Sementes maduras de maracujá-azedo *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” (Figura 1 A) foram obtidas a partir de coleta de frutos maduros na Unidade Experimental da UENF em Itaocara – Ilha Barra do Pomba (21°40' S, 42°04' W e altitude de 76 m). Os tegumentos das sementes foram removidos com auxílio de minimorsa e bisturi para facilitar a posterior retirada dos embriões zigóticos. As sementes sem os tegumentos (Figura 1 B) foram desinfestadas superficialmente em câmara de fluxo laminar mediante a imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 minuto, em seguida em hipoclorito de sódio comercial a (2 - 2,5% cloro ativo) por 25 minutos, acrescido de duas gotas do agente dispersante Tween-20 a 0,1% (v/v) a cada 100 mL<sup>-1</sup> de solução. Posteriormente, as sementes foram submetidas a quatro enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada e mantidas *overnight* em água destilada estéril. A retirada dos embriões zigóticos das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar. Os embriões zigóticos (Figura 1 C) foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e utilizados como explante nos experimentos de indução da embriogênese somática.



**Figura 1:** Sementes do maracujá-azedo *P. edulis* Sims cv. UENF “Rio Dourado”. A) Semente com tegumento. B) Semente sem tegumento utilizada para a desinfestação. C) Embrião zigótico excisado a partir da semente. Barras: 0,2 mm.

#### 4.2. Indução à embriogênese somática

Para determinação da melhor concentração dos reguladores de crescimento para indução da embriogênese somática, os embriões excisados da semente foram inoculados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel®. O meio de cultura foi acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D, combinado com 6-benziladenina (BA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.7 e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. As culturas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 25 °C ± 1, e no escuro por aproximadamente 45 dias.

A fim de buscar uma melhor compreensão sobre a indução dos calos de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” e conseqüentemente a determinação de um protocolo otimizado para a indução de calos embriogênicos para essa espécie, foram realizados dois experimentos de indução (Tabelas 2 e 3).

No experimento 1 (Tabela 2), foram testados o efeito da auxina 2,4-D, da citocinina BA e a interação entre esses dois reguladores de crescimento na indução de calos de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado”. Realizaram-se oito tratamentos com cinco repetições, e cada repetição contendo cinco embriões zigóticos.

No experimento 2 (Tabela 3), foram utilizados os tratamentos que obtiveram as melhores taxas de indução de calos no primeiro experimento, sendo seis tratamentos com quatro repetições e cada repetição com uma placa



contendo cinco embriões zigóticos, no qual, objetivou a caracterização dos dois tipos de calos (embriogênicos e não-embriogênicos) oriundos desses tratamentos.

**Tabela 2:** Tratamento de indução à embriogênese somática – 1º Experimento.

<b>Tratamentos</b>	<b>2,4-D (µM)</b>	<b>BA (µM)</b>
Controle	0	0
20 2,4-D	20	0
40 2,4-D	40	0
80 2,4-D	80	0
5 BA	0	5
20 2,4-D + 5 BA	20	5
40 2,4-D + 5 BA	40	5
80 2,4-D + 5 BA	80	5

**Tabela 3:** Tratamento de indução à embriogênese somática – 2º Experimento.

<b>Tratamentos</b>	<b>2,4-D (µM)</b>	<b>BA (µM)</b>
Controle	0	0
40 2,4-D	40	0
80 2,4-D	80	0
20 2,4-D + 5 BA	20	5
40 2,4-D + 5 BA	40	5
80 2,4-D + 5 BA	80	5

Ao final dos 45 dias de cultivo, as culturas foram avaliadas quanto à frequência de embriões zigóticos que induziram calos (Experimento 1) e quanto à média geral dos calos embriogênicos e não-embriogênicos (Experimento 2). Para tanto, foram considerados: calos com coloração amarelos e friáveis como embriogênicos; e calos esponjosos e translúcidos como não-embriogênicos (Campos et al., 2017). Posteriormente, as culturas foram transferidas para meio de multiplicação a cada 21 dias, por três multiplicações consecutivas, sob as mesmas condições descritas anteriormente, com a finalidade de multiplicar os calos embriogênicos.

### 4.3. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos

Para o experimento de maturação, foram utilizados calos embriogênicos e não-embriogênicos obtidos nos tratamentos (controle; 40, 80  $\mu\text{M}$  2,4-D; 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA), que foram selecionados em função dos resultados do 2º experimento de indução. Foram utilizadas placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e carvão ativado (CA) em diferentes concentrações no 1º experimento (Tabela 4), e no 2º experimento com apenas uma concentração de carvão ativado e adição de Polietilenoglicol (PEG) (Tabela 5). Nos dois experimentos, foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições por tratamento, e cada repetição foi composta por uma placa contendo três calos com 300 mg de matéria fresca.

As culturas foram mantidas em sala de cultivo a 25 °C  $\pm$  1 no escuro por sete dias e depois em fotoperíodo de 16h por 28 dias, no primeiro experimento, e 56 dias, no segundo experimento, com intensidade luminosa de 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As culturas foram avaliadas por meio da contagem do número de embriões somáticos produzidos nos estádios globular e cotiledonar, sendo: 1º experimento aos 28 dias; 2º experimento aos 28 e 56 dias.

No segundo experimento, foi realizada a avaliação de matéria fresca inicial (900 mg/placa) e matéria fresca ao final dos 28 dias de cultivo. E após esse mesmo período, foi realizada a análise histomorfológica das culturas.

**Tabela 4:** Tratamentos utilizados no 1º experimento de maturação com o uso de carvão ativado (CA) em diferentes concentrações.

Tratamentos	CA (g/L)
Controle	0
CA 1,0	1,0
CA 1,5	1,5
CA 3,0	3,0

**Tabela 5:** Tratamentos utilizados no 2º experimento de maturação com o uso de carvão ativado (CA) e polietilenoglicol (PEG).

Tratamentos	CA (g/L)	PEG (%)
Controle	0	0
CA	1,5	0
CA/PEG	1,5	6
PEG	0	6

A análise histomorfológica foi realizada para calos embriogênicos e não-embriogênicos para os tratamentos controle e os tratamentos com 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e PEG 6% do 2º experimento de maturação aos 28 dias de cultivo. Os calos foram fixados em solução contendo glutaraldeído (2,5 %) e formaldeído (4 %) diluídos em tampão fosfato (0,1 M) pH 7,2 por, no mínimo, 48 horas. Para preparar as amostras para microscopia óptica, as amostras foram desidratadas por duas vezes, em uma série de etanólica crescente de 30, 50, 70, 90 e 100%, com 1 hora em cada concentração. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com historesina e etanol 100% (1:1, v/v) durante 12 horas, e subsequentemente, com 100% historesina durante 24 horas e, em seguida, emblocadas em historesina Leica® (Silveira et al., 2013). Após o emblocamento, secções (cerca de 5 µm de espessura) foram cortadas e coradas com uma solução de 1% de azul de toluidina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Axioplan ZEISS, adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens e software Axio Vision LE versão 4.8 para análise das imagens.

#### 4.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), e os dados referentes à obtenção de calos embriogênico e não-embriogênicos, bem como de maturação e matéria fresca, foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R Core Team 2014).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Indução da embriogênese somática

No experimento 1, foram testados o efeito da auxina 2,4-D, da citocinina BA e a interação entre esses reguladores de crescimento na indução de calos de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” (Tabela 2).

Os tratamentos 40, 80  $\mu$ M 2,4-D e 20 40 e 80  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M BA apresentaram as maiores porcentagens de indução, entre 92 e 100% de calos por tratamento (Tabela 6). Dentre os tratamentos que induziram a formação de calos, o tratamento 20  $\mu$ M 2,4-D foi o que apresentou a menor porcentagem de indução, 16% (Tabela 6), o que demonstra que a indução de calos em *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” demanda concentrações mais altas de auxina, ou sua combinação com uma citocinina.

No início da formação das massas pró-embriogênicas, foram observados dois padrões de formação, alguns na região do eixo embrionário (Figura 2 A) e outros na região cotiledonar do embrião zigótico (Figura 2 B).

Em relação aos aspectos morfológicos dos calos obtidos, foi possível verificar que os calos não-embriogênicos apresentaram aspecto esponjoso e coloração translúcida (Figura 2 C), e os calos embriogênicos apresentaram aspecto friável e coloração amarelo-brilhante (Figura 2 D).

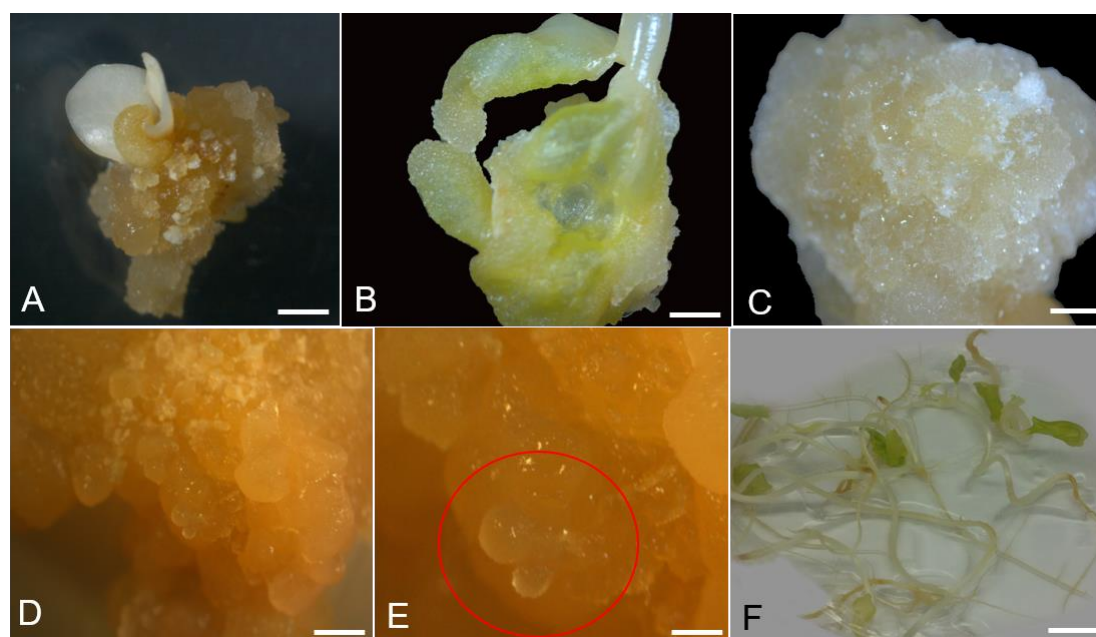
Ao final do período de multiplicação, o tratamento 20  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M BA apresentou a formação de regiões contendo alguns embriões no estágio globular

(Figura 2 E). Em adição, o tratamento controle e 5  $\mu\text{M}$  de BA não induziram a formação de calos (Figura 2 F).

**Tabela 6:** Porcentagem de indução dos calos por tratamento.

Tratamentos	Indução (%)
Controle	0,0c
20 2,4-D	16b
40 2,4-D	100a
80 2,4-D	100a
5 BA	0,0c
20 2,4-D + 5 BA	100a
40 2,4-D + 5 BA	92a
80 2,4-D + 5 BA	100a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $P < 0,05$ ).  $n = 5$



**Figura 2:** Padrão de indução e desenvolvimento da embriogênese somática na cultura de *P. edulis* cv. UENF "Rio Dourado". A) Início da indução na região do eixo embrionário. B) Início da indução na região cotiledonar. C) Calo não-embriogênico. D) Calo embriogênico. E) Embrião no estágio globular no 20  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA. F) Germinação dos embriões zigóticos submetidos ao meio controle. Barras: A, B, E: 0,5 mm. C, D, F: 0,2 mm.

No experimento 2, foi possível observar que os tratamentos com a combinação de 2,4-D e BA nas concentrações de 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA resultaram na maior porcentagem de calos embriogênicos formados de 60 e 54% respectivamente (Tabela 7), não diferindo estatisticamente entre si. Este resultado demonstra a importância do balanço auxina citocinina na indução dos calos de *P. edulis* cv. "UENF Rio Dourado". Os tratamentos contendo 40 e 80  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram as menores taxas de formação de calos embriogênicos, sendo 2% e 9%, respectivamente (Tabela 7). Esses tratamentos apresentaram calos com aspectos não-embriogênicos, com coloração translúcida e aspecto não friável (Figura 3 A).

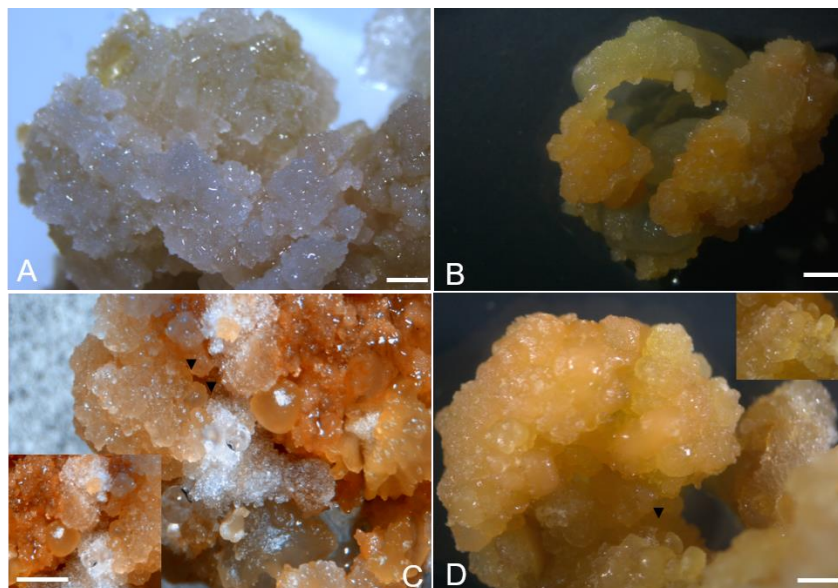
**Tabela 7:** Porcentagem de indução dos calos embriogênicos e não-embriogênicos por tratamento.

Tratamentos	Embriogênicos (%)	Não-embriogênico (%)
Controle	0 b	100 a
40 2,4-D	2 b	98 a
80 2,4-D	9 b	91 a
20 2,4-D + 5 BA	60 a	40 b
40 2,4-D + 5 BA	54 a	46 b
80 2,4-D + 5 BA	54 a	46 b
CV (%)	28,8	12,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $P < 0,05$ ). n = 4.

Durante o período de indução, foi possível observar que, nos tratamentos 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA, alguns calos apresentaram aspecto embriogênico e não-embriogênico (Figura 3 B), com as porções embriogênicas formadas por aglomerados celulares de coloração amarela. Nestes mesmos calos, também foi possível ver que, em algumas porções embriogênicas, ocorreu a formação de estruturas semelhantes a embriões globulares, no decorrer do último subcultivo na fase de multiplicação (Figura 3 C).

No final da fase de multiplicação, verificou-se a formação de embriões somáticos no estágio globular, principalmente no tratamento 20  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA (Figura 3 D).



**Figura 3:** Padrões de indução e desenvolvimento da embriogênese somática na cultura de *P. edulis* cv. UENF “Rio Dourado”. A) Calo não-embriogênico. B) Calo com porção embriogênica e não-embriogênica encontrado nos tratamentos com 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA. C) Estruturas organizadas semelhantes a embriões globulares na fase de multiplicação (setas). D) Embriões somáticos no estágio globular ao final da fase de multiplicação. Barras: A, B: 0,2 mm. C, D: 0,1 mm.

## 5.2. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos

Na maturação dos calos de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” também foram realizados dois experimentos. No primeiro, testou-se a influência do carvão ativado na maturação dos calos e, no segundo, a influência do carvão ativado, do PEG e a interação desses dois promotores de maturação.

Após a indução, as culturas foram submetidas aos tratamentos de maturação, em que foi observado que o tratamento contendo 1,5 g L<sup>-1</sup> de CA apresentou a maior média de formação de embriões somáticos, 7,6 embriões por placa (Tabela 8). No tratamento controle, não foi observada a formação de embriões somáticos, enquanto, nos tratamentos 1,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup> CA, ocorreram as menores médias de formação de embriões somáticos, 0,4 e 1,4 embriões (Tabela 8).

**Tabela 8:** Taxa de maturação (média de embriões) do 1º experimento aos 28 dias de cultivo.

Tratamentos (g/L)	Nº embriões
Controle	0,0 b
CA 1,0	0,4 b
CA 1,5	7,6 a
CA 3,0	1,4 b
<b>CV (%)</b>	<b>79,3</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $P < 0,05$ ).  $n = 5$ .

No segundo experimento, além do número total de embriões formados, também foi avaliado o número de embriões somáticos por estágio (globular e cotiledonar) (Figura 4 A, C, D), de forma a verificar se havia a progressão dos embriões somáticos.

Aos 28 e 56 dias de maturação, os tratamentos, controle e CA (1,5 g/L)/PEG (6%) não apresentaram maturação das culturas. Notou-se que o tratamento que promoveu a diferenciação do maior número de embriões foi o PEG (6%), com uma média de 10,6 embriões globulares e 14,0 embriões cotiledonares por placa aos 56 dias de cultivo. Enquanto isso, o tratamento CA (1,5 g/L) apresentou uma média de 3,6 para embriões globulares e 4,4 para embriões cotiledonares aos 56 dias de cultivo (Tabela 9).

**Tabela 9:** Número médio de embriões (embriões/placa) nos estádios globular e cotiledonar aos 28 dias e 56 dias em diferentes tratamentos de maturação no 2º experimento.

Tratamentos	28 dias		56 dias	
	Globular	Cotiledonar	Globular	Cotiledonar
Controle	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
CA (1,5 g/L)	3,2 b	3,8 b	3,6 b	4,4 b
CA (1,5 g/L)/PEG (6%)	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
PEG (6%)	8,2 a	11,6 a	10,6 a	14,0 a
<b>CV (%)</b>	<b>36,8</b>	<b>60,2</b>	<b>40,0</b>	<b>49,5</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $P < 0,05$ ).  $n = 5$ .



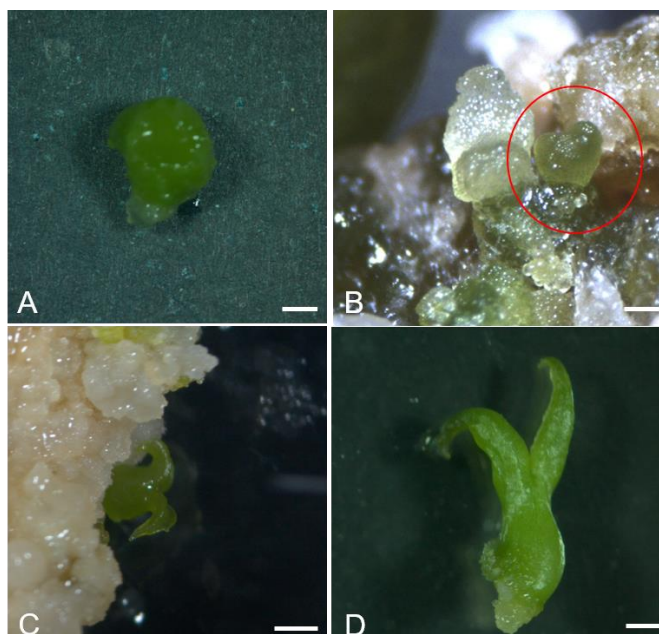
Na fase de maturação das culturas embriogênicas, foi observado que, o tratamento controle não influenciou na maturação (Tabela 9); no entanto, apresentou o maior incremento em matéria fresca final aos 28 dias de maturação (Tabela 10). A matéria fresca final dos tratamentos CA (1,5 g/L), CA (1,5 g/L)/PEG (6%) e PEG (6%) não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 10).

**Tabela 10:** Incremento em matéria fresca inicial e final e total do aumento da matéria fresca aos 28 dias de maturação.

<b>Tratamentos</b>	<b>Matéria fresca Inicial (g)</b>	<b>Matéria fresca Final (g)</b>
Controle	0,9	2,5 a
CA (1,5 g/L)	0,9	1,3 b
CA (1,5 g/L)/PEG (6%)	0,9	1,1 b
PEG (6%)	0,9	1,5 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $P < 0,05$ ).  $n=4$ . CV (%) 15,9.

Neste trabalho, não foi possível contabilizar, de forma considerável, embriões no estágio torpedo e codiforme; no entanto, foi possível registrar a presença do embrião no estágio codiforme (Figura 4 B).

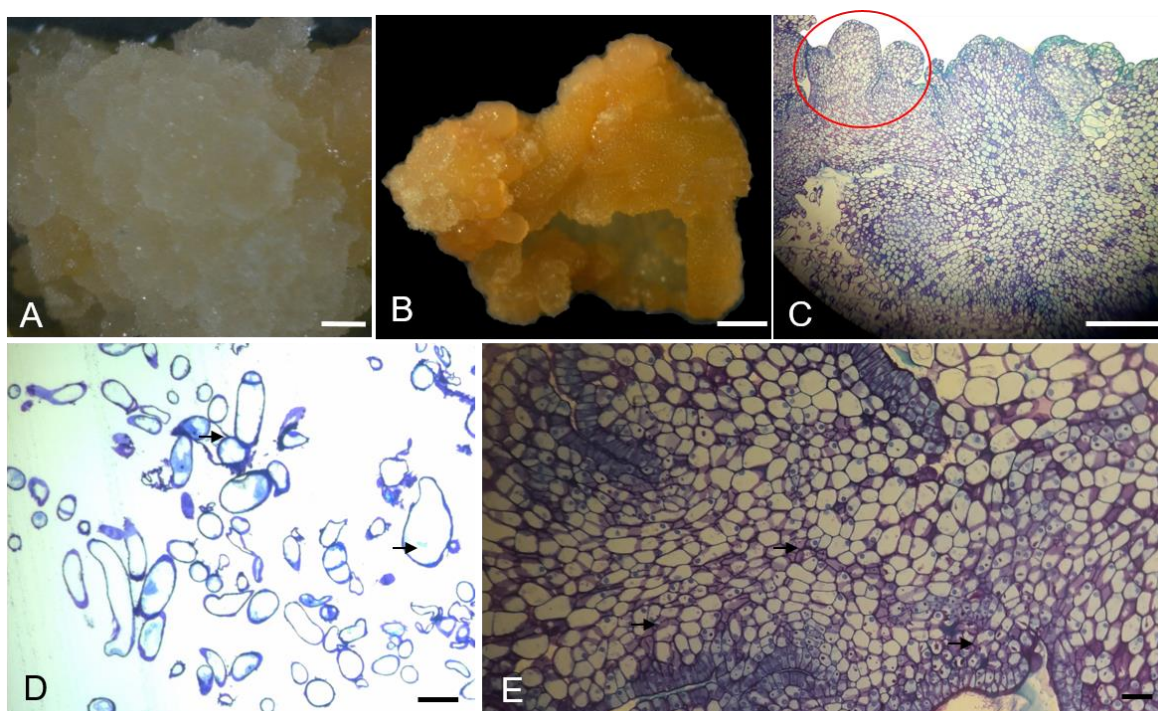


**Figura 4:** Embriões somáticos na maturação de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado”. A) Embrião globular. B) Embrião codiforme. C D) Embriões cotiledonares. Barras: 0,2 mm

Com o intuito de observar a dinâmica dos calos embriogênicos e não-embriogênicos de *P. edulis* cv. UENF “Rio Dourado”, foi realizado o estudo histomorfológico com os tratamentos Controle → correspondente aos calos não-embriogênicos, e PEG (6%) (melhor tratamento de maturação) para este estudo.

O calo era definido como embriogênico e não-embriogênico durante cada subcultivo por meio das colorações e aspectos que apresentavam (Figura 5 A e B). O calo não-embriogênico exibiam um aspecto esponjoso ou uma massa mole com coloração translúcida e, a cada subcultivo, os calos apresentavam um grande incremento em matéria fresca (Figura 5 A). O calo embriogênico apresentava um aspecto compacto e coloração amarelo-brilhante (Figura 5 B).

Na análise histomorfológica, foi possível observar que, ao serem transferidos para o meio de maturação, os calos com aspecto não-embriogênico mantiveram a mesma morfologia e, anatomicamente, apresentaram células dispersas, com vacúolos grandes e formas largas ou alongadas (Figura 5 D). Enquanto os calos embriogênicos eram de aspecto compacto e suave, com clusters embriogênicos (Figura 5 C); anatomicamente, essas células eram pequenas e isodiaméticas, com núcleos proeminentes e citoplasma denso (Figura 5 E).



**Figura 5:** Aspectos gerais do estudo histomorfológico de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” no 2º experimento de maturação aos 28 dias de cultivo. A) Calo não-embriogênico. B) Calo embriogênico. C) Regiões com células organizadas e formação de pró-embriões (círculo vermelho) que precederam a formação de embriões no tratamento de maturação (PEG 6%). D) Anatomia do calo não-embriogênico (setas indicando ortocromatia). E) Anatomia do calo embriogênico (setas indicando as paredes metacromáticas). Barras: A, B: 0,2 mm. C, D, E: 100, 50, 20  $\mu$ m, respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Indução da embriogênese somática

Embora haja semelhança nos processos de embriogênese zigótica e embriogênese somática, o desenvolvimento de embriões zigóticos começa a partir da fertilização e da formação do zigoto, enquanto que as células somáticas adquirem competência embriogênica como resultado de diferentes estímulos físicos e químicos (Karami et al., 2009).

Fatores como reguladores de crescimento vegetal são determinantes para a otimização de trabalhos com embriogênese somática (Dudits et al., 1991). De modo geral, as auxinas e citocininas estão entre os principais reguladores de crescimento envolvidos no ciclo celular das plantas, sendo responsáveis pelos processos de divisão e diferenciação celular (Fehér et al., 2003; Pinto et al., 2011).

Além disso, outro fator importante é o genótipo da planta matriz doadora dos explantes utilizados, que, juntamente com o tipo de auxina escolhido, exercem a influência fundamental para que ocorra a competência embriogênica (Guerra et al., 2001).

A utilização de embriões zigóticos como fonte de explante para a indução da embriogênese somática em espécies de *Passiflora* sp. já é reportada na literatura e apresenta resultados positivos para a obtenção de culturas

embriogênicas (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2011; Rosa et al., 2014; da Silva et al., 2015; de Oliveira Prudente et al., 2017).

Em relação a uma extensa base de experimentação com diversas variedades de plantas, as auxinas exógenas aplicadas no cultivo *in vitro* são consideradas indutores-chave para o desenvolvimento embriogênico em células somáticas de plantas, pois são mediadoras de uma cascata de transdução de sinais, levando à reprogramação gênica, que, ao induzir um calo desorganizado e/ou organizado polarmente, este pode culminar na formação de um embrião somático (Dudits et al., 1991).

No presente trabalho, foi possível observar que a utilização de auxina, bem como entre auxina e citocinina levaram à via de embriogênese somática indireta, com a formação de calos e posteriormente a conversão em embriões somáticos.

Em ambos os experimentos, os melhores resultados obtiveram-se com 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D isolado e combinado com 5  $\mu\text{M}$  BA (1º experimento) e 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  2,4-D + 5  $\mu\text{M}$  BA (2º experimento), o que mostrou que, para iniciar a embriogênese somática, foi necessário o estímulo causado pelas altas concentrações de auxinas isolada e/ou combinada com citocinina.

Resultados semelhantes foram observados por (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012; Ferreira et al., 2015; de Oliveira Prudente et al., 2017), que obtiveram a indução de culturas embriogênicas com a combinação de auxina/citocinina em diferentes espécies de *Passiflora* sp. Outros trabalhos utilizando auxina isolada e/ou combinada também foram reportados na embriogênese somática a partir de embriões zigóticos como *F. sellowiana* (Guerra et al., 2001); *C. nucifera* (Perez-Nunez et al., 2009) e *C. Papaya* (Vale et al., 2018).

Nos respectivos experimentos, a utilização do tratamento controle e 5  $\mu\text{M}$  BA (1º experimento) e o controle (2º experimento) não induziram à formação de culturas de calos, mostrando-se necessária a utilização de agentes indutores para dar o início ao processo de embriogênese somática de *P. edulis* cv. "UENF Rio Dourado".

Semelhantemente, Silva et al. (2009) não obtiveram a formação de culturas de calos no tratamento controle e 4,4  $\mu\text{M}$  de BA, que resultou apenas na germinação dos embriões zigóticos. Fatores genéticos e fisiológicos são

importantes no processo embriogênico influenciando para que o padrão de gene já expresso em um determinado tecido possa ser substituído por um novo programa de expressão dos genes embriogênicos (Zeng et al., 2007).

A aplicação da auxina induz o potencial embriogênico das células somáticas quiescentes mitoticamente (Karami et al., 2009). O 2,4-D pode estimular essa indução, pois age duplamente por meio do estímulo, sendo um promotor do estresse, e por atuar como uma auxina diretamente ou interferindo no metabolismo do ácido indolacético (AIA), que é uma auxina endógena nos vegetais (Fehér et al., 2002).

No processo de indução da embriogênese somática e/ou outros tipos de embriogênese, diferentes genes são responsáveis por regular o desenvolvimento das plantas (Fehér, 2015). Na embriogênese somática, a expressão de genes da família SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) são consideradas como marcadores moleculares da aquisição da competência celular, envolvido principalmente do início da indução até a formação do embrião no estágio globular (Schmidt et al., 1997).

Estudos referentes à expressão do gene SERK já foram relatados em *C. nucifera* (Perez-Nunez et al., 2009) e *P. edulis* "FB100" (Rocha et al., 2015a), que mostram que a sua expressão está relacionada à fase inicial da embriogênese somática, principalmente nas regiões pró-embriogênicas até a fase globular.

A utilização do tratamento de indução de 20  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M BA permitiu a obtenção de calos embriogênicos que progrediram para a formação dos clusters embriogênicos, os quais precederam à formação de embriões globulares ao final do período de indução (Figura 4 C). Resultados semelhantes foram conseguidos em *P. cinnamomum*, em que o tratamento com 18,1  $\mu$ M 2,4-D + 4,4  $\mu$ M BA resultou nas maiores porcentagens de indução e na formação de clusters embriogênicos que precederam à formação de embriões globulares antes da maturação (Silva et al., 2009).

## **6.2. Maturação e análise histomorfológica de calos embriogênicos e não-embriogênicos**

Após o processo de indução pelo estímulo adequado da auxina, as células competentes começam a formar embriões somáticos no processo de maturação, que geralmente ocorre com a remoção da auxina e a adição dos promotores de maturação (Silveira et al., 2013).

A maturação é a fase mais crítica na embriogênese somática, pois é nesta etapa que ocorre a expansão, a diferenciação e o acúmulo de substância de reservas que irá ser determinante para a posterior fase de germinação e a regeneração dos embriões somáticos em plântulas (Mishra et al., 2012). No primeiro experimento de maturação, como descrito anteriormente, pode-se observar que o maior número de embriões foi obtido no tratamento com 1,5 g L<sup>-1</sup> CA. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2009) com *P. cincinnata*, que, ao usar carvão ativado no meio de diferenciação, observou o aumento dos clusters embriogênicos, os quais diferenciaram em embriões nos diferentes estádios.

A suplementação do meio de cultura com carvão ativado influenciou na maturação de embriões somáticos de *B. orellana* (Paiva Neto et al., 2003). Durante o cultivo *in vitro*, diversos compostos tóxicos são liberados, seja durante a autoclavagem, seja liberados pelo próprio tecido. Dessa forma, um dos benefícios do carvão ativado é atribuído à sua capacidade de adsorver esses compostos que podem influenciar no desenvolvimento e/ou inibir à embriogênese (Pan e Van Staden, 1998).

Dessa forma, podemos inferir que a utilização do carvão ativado no primeiro experimento pode ter agido de forma satisfatória na remoção de compostos fenólicos e resíduos do 2,4-D acumulados ao longo da fase de multiplicação e influenciado no posterior desenvolvimento e diferenciação dos embriões somáticos.

O tratamento com 1,5 g L<sup>-1</sup> CA foi superior aos demais tratamentos (0, 1,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup> CA). Esses resultados corroboram com Silveira et al. (2013), que obtiveram, após 28 dias de cultivo, um aumento na produção de embriões somáticos em cana-de-açúcar.

No segundo experimento, o agente de maturação PEG foi testado com o intuito de verificar se haveria um aumento na taxa de maturação dos embriões somáticos de *P. edulis* cv. "UENF Rio Dourado". Dessa forma, o número de

embriões globulares e cotiledonares no tratamento com PEG foram superiores ao tratamento com carvão ativado (Tabela 10).

O CA e PEG são amplamente utilizados como maturadores em experimentos de embriogênese somática de *P. cincinnata* (Silva et al., 2009), *S. officinarum* (Silveira et al., 2013) e *C. papaya* (Vale et al., 2018), dentre outras espécies.

O PEG é um agente não plasmolizante e apresenta em sua composição moléculas de alto peso molecular incapazes de atravessar a parede celular, possibilitando que ocorra a osmorregulação celular e haja a dessecação; por isso, é considerado um agente de maturação eficaz principalmente em algumas espécies de coníferas (Attree et al., 1991; Walker e Parrott, 2001).

O PEG é um agente de maturação que induz o déficit hídrico levando à dessecação do embrião, o que influencia na produção do ABA que sintetiza as substâncias de reserva, ocorrendo, assim, o desenvolvimento do embrião somático nos diferentes estádios de desenvolvimento (Stasolla e Yeung, 2003).

Na embriogênese zigótica, o ABA é considerado um hormônio vegetal importante que afeta diretamente o desenvolvimento das sementes pela prevenção da germinação precoce, promoção do acúmulo de substâncias de reserva, promoção da maturação e redução da frequência de morfologias anormais (Garcia-Martin et al., 2005).

As sementes sintetizam ABA durante a maturação para acumular reservas e induzir a dormência (Milborrow, 2001). Durante a fase de desenvolvimento, maturação e germinação do embrião, genes são expressos abundantemente nos estádios tardios da embriogênese até a maturação das sementes, e esses genes são regulados pela presença de ABA (Garcia-Martin et al., 2005).

No momento em que os níveis endógenos de ABA diminuem, o “start” para a germinação é iniciado devido à dessecação (Find, 1997). Ao relacionar a dessecação com a regulação hormonal do embrião somático, compreende-se que a fase de desenvolvimento e a de maturação são necessárias para preparar os embriões maduros para uma germinação eficiente (Garcia-Martin et al., 2005).

Dessa forma, podemos compreender melhor a ação do PEG no presente trabalho, possivelmente por ter influenciado nos níveis endógenos de ABA permitindo o desenvolvimento de embriões somáticos.



Esse efeito positivo na maturação de calos de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” em relação ao desenvolvimento dos estádios embrionários e posteriormente a germinação dos embriões cotiledonares, pode também ter sido influenciado pela característica da semente de maracujazeiro, que apresenta um tipo de armazenamento intermediário (Liu et al., 2008) sendo susceptível ao conteúdo de PEG exposto à célula. Dessa forma, o PEG pode estar mimetizando a dessecação que ocorreria naturalmente no embrião zigótico.

O PEG já é utilizado em algumas espécies como *C. Papaya* (Heringer et al., 2013; Vale et al., 2014), apresentando resultados positivos e levando a uma maior taxa de maturação dos embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento. A utilização do PEG também resultou um maior desenvolvimento e uma maior capacidade de regeneração dos embriões de *P. ginseng* (Langhansova et al., 2004).

Este é o primeiro relato da utilização de PEG na maturação de *Passiflora* sp.; assim, podemos observar (Figura 4) que o PEG influenciou na maturação de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado” e teve sua maior taxa de obtenção de embriões no estágio cotiledonar (Tabela 9).

A utilização de agentes de maturação foi fundamental para influenciar a diferenciação de calos em embriões somáticos de *P. edulis* cv “UENF Rio Dourado”, uma vez que o estresse promovido por agentes como o (PEG) ou a adsorção de compostos tóxicos promovida pelo carvão ativado (CA) são importantes para o “início” da diferenciação dos embriões.

A análise histomorfológica dos calos embriogênicos e não-embriogênicos permitiu não só a caracterização da morfologia desses dois tipos de células como também a confirmação da natureza embriogênica dos calos provenientes do tratamento PEG (6%).

De acordo com as análises histomorfológicas, o calo embriogênico apresentou pequenas células isodiamétricas, enquanto que as células do calo não-embriogênico eram alongadas, com grandes vacúolos dispersos ao longo do calo (Figura 5 D-E). Essas diferenças confirmam a caracterização do calo embriogênico e não-embriogênico relatado não só em *P. edulis* (Pinto et al., 2011) como também em outras espécies, tais como *C. papaya* (Vale et al., 2014), *S. officinarum* (Silveira et al., 2013) e *C. arábica* (Quiroz-Figueroa et al., 2002).

Calos não-embriogênicos apresentaram reação predominante ortocromática indicando a ausência de grupamentos ácidos, enquanto os calos embriogênicos apresentaram reação metacromática na parede celular, com coloração violácea indicando a presença de polissacarídeos ácidos. A presença de polissacarídeos ácidos na parede celular é reportada em calos embriogênicos de outras espécies como *M. arborea* (Endress et al., 2009), *T. nigrescens* (Pilarska et al., 2013) e *A. angustifolia* (Steiner et al., 2016) e pode estar relacionada à presença de polissacarídeos importantes como a pectina, envolvida no crescimento, desenvolvimento e morfogênese dos vegetais (Jarvis et al., 2003; Pilarska et al., 2013).

Decorrida a análise histomorfológica aos 28 dias, os calos e embriões diferenciados ainda continuaram no cultivo em meio de maturação e, aos 56 dias, foi possível fazer a contagem dos embriões no estágio cotiledonar. Os embriões cotiledonares foram transferidos para o meio sem adição de reguladores de crescimento para o seu subsequente desenvolvimento e regeneração em plântula.

A partir dos dois experimentos de indução realizados, foi estabelecido o tratamento de indução 20 uM de 2,4-D + 5 uM de BA a ser utilizado para a embriogênese somática de *P. edulis* cv. UENF “Rio Dourado”, pois apresentava a menor concentração de 2,4-D. Ao final da fase de multiplicação, foi possível observar embriões somáticos no estágio globular. Na etapa de maturação, o tratamento contendo PEG (6%) apresentou a maior média de embriões globulares e cotiledonares, além de um total de 123 embriões somáticos ao final dos 56 dias de cultivo.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos acerca da indução e maturação da embriogênese somática em *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado”, foi possível obter as seguintes conclusões:

- a) O tratamento que permitiu a maior taxa de indução foi 20 uM 2,4-D + 5 uM BA com uma média de 60% de calos embriogênicos.
- b) A utilização de PEG (6%) possibilitou a maior média de embriões cotiledonares ao final dos 56 dias de cultivo, com um número médio de 14 embriões cotiledonares por placa.
- c) A análise histomorfológica propiciou caracterizar os calos embriogênicos e não-embriogênicos aos 28 dias de maturação de *P. edulis* cv. “UENF Rio Dourado”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P.P., Souza, M.M., Santos, E.A., Pires, M.V., Pires, M.M. , de Almeida, A.-A.F. (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica* 166(3):307-315.
- Anthony, P., Otoni, W., Power, J.B., Lowe, K.C. , Davey, M.R. (1999) Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. *In*: Hall, H. (ed) Plant cell culture protocols. Totowa: Humana Press, p. 169-181.
- Attree, S., Moore, D., Sawhney, V. , Fowke, L. (1991) Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce *Picea glauca* Moench Voss somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany* 68(6):519-525.
- Baudino, S., Hansen, S., Brettschneider, R., Hecht, V.F., Dresselhaus, T., LoËrz, H., Dumas, C. , Rogowsky, P.M. (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213(1):1-10.
- Bernacci, L., Vitta, F. , Bakker, Y. (2003) Passifloraceae. *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo* 3:247-274.
- Borém, A. , Fritsche-Neto, R. (2014) *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. 1 ed., San Diego: Academic Press, 1-272p.

- Bruckner, C., Casali, V., De Moraes, C., Regazzi, A. , Da Silva, E. (1995) Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulture* 370:45-58.
- Campos, N.A., Panis, B. , Carpentier, S.C. (2017) Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. *Frontiers in plant science* 8:1-12.
- Carmo, T.V.B., Martins, L.S.S., Musser, R.d.S., Silva, M.M.D. , Santos, J.P.O. (2017) Genetic Diversity in accessions op *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. *Revista Caatinga* 30(1):68-77.
- Cerqueira-Silva, C., Conceição, L., Souza, A. , Corrêa, R. (2014) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *European journal of plant pathology* 139(2):261-270.
- Chaudhury, A. , Qu, R. (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60(2):113-120.
- da Silva, G.M., da Cruz, A.C.F., Otoni, W.C., Pereira, T.N.S., Rocha, D.I. , da Silva, M.L. (2015) Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 51(5):539-545.
- de Feria, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M. , Quiala, E. (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(1):1-6.
- de Jong, A.J., Schmidt, E.D. , de Vries, S.C. (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant molecular biology* 22(2):367-377.
- de Melo, N., Cervi, A. , Guerra, M. (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 226(1-2):69-84.

- de Melo, N.F. , Guerra, M. (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92(2):309-316.
- de Moraes Silva, M.G., Viana, A.P., Gonçalves, G.M., do Amaral Júnior, A.T. , Pereira, M.G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia* 33(1):170-176.
- de Oliveira Prudente, D., Paiva, R., Carpentier, S., Swennen, R., Nery, F.C., Silva, L.C. , Panis, B. (2017) Characterization of the formation of somatic embryos from mature zygotic embryos of *Passiflora ligularis* Juss. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131(1):97-105.
- de Sousa, L.B., de Melo, L.F., de Freitas, R.d.C.A., Setubal, J.W. , Rezende, D.F. (2010) Germinação e emergência de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 5(4):190-194.
- Deo, P.C., Tyagi, A.P., Taylor, M., Harding, R. , Becker, D. (2010) Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 28(1):27-40.
- Dudits, D., Bogre, L. , Gyorgyey, J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99(3):473-482.
- Elhiti, M., Stasolla, C. , Wang, A. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49(6):631-642.
- Elhiti, M.A. (2010) Molecular characterization of several *Brassica* shoot apical meristem genes and the effect of their altered expression during *in vitro* morphogenesis. 61(12):4069-4085.
- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Peixoto, J. , JUNQUEIRA, N. (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro-desafios da pesquisa. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados*:187-210.

- Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1849(4):385-402.
- Fehér, A., Pasternak, T., Otvos, K., Miskolczi, P. , Dudits, D. (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Section Botany* 57:5-12.
- Fehér, A., Pasternak, T.P. , Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74(3):201-228.
- Ferraz, J. , Lot, L. (2007) Fruta para consumo in natura tem boa perspectiva de renda. *Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria*:387-388.
- Ferreira, D.A.T., Sattler, M.C., Carvalho, C.R. , Clarindo, W.R. (2015) Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for *in vitro* propagation without plant growth regulators. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 122(3):629-638.
- Ferreira, G., Fogaça, L. , Moro, E. (2001) Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. *Revista Brasileira de fruticultura* 23(1):160-163.
- Find, J.I. (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce *Picea abies* L. Karst. in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Science* 128(1):75-83.
- Flora do Brasil (2017) Passifloraceae. 2017. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB182> >. Acesso em: 11 de fevereiro.
- Garcia-Martin, G., Manzanera, J. , González-Benito, M. (2005) Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80(2):171-177.
- George, E.F., Hall, M.A. , De Klerk, G.-J. (2008) Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors Plant propagation by tissue culture. Springer, p. 175-204.

- Guan, Y., Li, S.-G., Fan, X.-F. , Su, Z.-H. (2016) Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Frontiers in plant science* 7:938.
- Guerra, M., Torres, A., Teixeira, J., Torres, A., Caldas, L. , Buso, J. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* 2:533-568.
- Guerra, M.P., Dal Vesco, L.L., Ducroquet, J.P.H., Nodari, R.O. , Reis, M.S. (2001) Somatic embryogenesis in Goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(2):117-128.
- Guerra, M.P., Silveira, V., dos Santos, A.L., Astarita, L.V. , Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* BERT O. KTZE Somatic embryogenesis in woody plants. Springer, p. 457-478.
- Heinz, R., de Sousa Mota, L.H., Gonçalves, M.C., Viegas Neto, A.L. , Carlesso, A. (2012) Seleção de progênies de meio-irmãos de milho para eficiência no uso de nitrogênio. *Revista Ciência Agronômica* 43(4)
- Heringer, A.S., Vale, E.M., Barroso, T., Santa-Catarina, C. , Silveira, V. (2013) Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 25(2):116-124.
- Horstman, A., Bemer, M. , Boutilier, K. (2017) A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*(4):201-216.
- IBGE (2016) Produção brasileira de maracujá em 2016. 2016. Disponível em: < [http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/maracuja/b1\\_maracuja.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf) >. Acesso em: 22-09.
- Jarvis, M., Briggs, S. , Knox, J. (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* 26(7):977-989.
- Jesus, O.N.d., Martins, C.A.D., Oliveira, E.J.d., Soares, T.L., Faleiro, F.G. , Bernacci, L. (2017) Importance of the characterization of genetic resources of passion fruit. *In: Jesus, O.N.D., Oliveira, E.J.D., Faleiro, F.G., Soares, T.L. , Girardi, E.A. (eds) Illustrated morpho-agronomic descriptors for Passiflora spp.* Brasília: Embrapa, vol 1, p. 9-17.



- Karami, O., Aghavaisi, B. , Pour, A.M. (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology* 2(4):177-190.
- Karami, O. , Saidi, A. (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular biology reports* 37(5):2493-2507.
- Krikorian, A. , Berquam, D.L. (1969) Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *The Botanical Review* 35(1):59-67.
- Kumar, V. , Van Staden, J. (2017) New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(9):194.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R.J., Aitken, K.S., Grof, C.L., Bonnett, G.D. , Smith, G.R. (2005) Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41(4):345-363.
- Langhansova, L., Konradova, H. , Vaněk, T. (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Reports* 22(10):725-730.
- Liu, K., Eastwood, R., Flynn, S., Turner, R. , Stuppy, W. (2008) Seed information database: *Passiflora*. 2008. Disponível em: < <http://data.kew.org/sid/> >. Acesso em: 03 de fevereiro.
- Martin, F.W. , Nakasone, H.Y. (1970) The edible species of *Passiflora*. *Economic Botany* 24(3):333-343.
- Meletti, L. , Bruckner, C. (2001) Melhoramento genético. In: Bruckner, C. , Picanço, M. (eds) Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. . Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de fruticultura* 33(SPE1):83-91.
- Meletti, L.M.M. , Maia, M.L. (1999) *Maracujá: produção e comercialização*. Instituto Agrônômico,
- Milborrow, B. (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of experimental botany* 52(359):1145-1164.

- Mishra, S., Sanyal, I. , Amla, D. (2012) Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in *Chickpea*. *Biologia plantarum* 56(4):613-619.
- Murashige, T. , Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3):473-497.
- Muschner, V.C., Zamberlan, P.M., Bonatto, S.L. , Freitas, L.B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and molecular biology* 35(4):1036-1043.
- Nomura, K. , Komamine, A. (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology* 79(4):988-991.
- Otoni, W., Blackhall, N., Vaz, F.d.U., Casali, V., Power, J. , Davey, M. (1995) Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. *Journal of experimental botany* 46(7):777-785.
- Otoni, W., Paim Pinto, D., Rocha, D., Vieira, L., Dias, L., Silva, M., Silva, C., Lani, E., Silva, L. , Tanaka, F. (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit *Passiflora* sps. In: Aslam J, Srivastava, O. , Sharma, M. (eds) Somatic embryogenesis and gene expression. . 1 ed., New Delhi Narosa Publishing House, p. 1-17.
- Pacheco, G., Simão, M.J., Vianna, M.G., Garcia, R.O., Vieira, M.L.C. , Mansur, E. (2016) *In vitro* conservation of *Passiflora* — A review. *Scientia Horticulturae* 211:305-311.
- Paiva Neto, V.B., Botelho, M.N., Aguiar, R., Silva, E.A. , Otoni, W.C. (2003) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto *Bixa orellana* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39(6):629-634.
- Pan, M. , Van Staden, J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture—A review. *Plant Growth Regulation* 26(3):155-163.
- Perez-Nunez, M., Souza, R., Sáenz, L., Chan, J., Zuniga-Aguilar, J. , Oropeza, C. (2009) Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports* 28(1):11-19.

- Pérez, J.O., d'Eeckenbrugge, G.C., Restepo, M., Jarvis, A., Salazar, M., Caetano, C. (2007) Diversity of Colombian Passifloraceae biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana* 8(1):1-45.
- Pilarska, M., Knox, J.P., Konieczny, R. (2013) Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 115(1):35-44.
- Pinto, D.L.P., de Almeida, A.M.R., Rêgo, M.M., da Silva, M.L., de Oliveira, E.J., Otoni, W.C. (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 107(3):521-530.
- Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R., Loyola-Vargas, V. (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20(12):1141-1149.
- R Core Team 2014 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.
- Rocha, D.I., Monte-Bello, C.C., Dornelas, M.C. (2015a) Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 120(3):1087-1098.
- Rocha, D.I., Pinto, D.L.P., Vieira, L.M., Tanaka, F.A.O., Dornelas, M.C., Otoni, W.C. (2015b) Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. *Protoplasma* 253(2):595-609.
- Rocha, D.I., Vieira, L.M., Tanaka, F.A.O., da Silva, L.C., Otoni, W.C. (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249(3):747-758.

- Rosa, Y.B.C.J., Bello, C.C.M. , Dornelas, M.C. (2014) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120(1):69-77.
- Salajova, T., Salaj, J. , Kormutak, A. (1999) Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science* 145(1):33-40.
- Salomão, L.C.C., Pereira, W.E., Duarte, R.C.C. , Siqueira, D.L.D. (2002) Propagation of *Passiflora alata* and *P. edulis* f. *flavicarpa* by cutting. *Revista Brasileira de fruticultura* 24(1):163-167.
- Schmidt, E., Guzzo, F., Toonen, M. , De Vries, S. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124(10):2049-2062.
- Silva, M.L., Pinto, D.L.P., Guerra, M.P., Floh, E.I.S., Bruckner, C.H. , Otoni, W.C. (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(1):47-54.
- Silveira, V., de Vita, A.M., Macedo, A.F., Dias, M.F.R., Floh, E.I.S. , Santa-Catarina, C. (2013) Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 114(3):351-364.
- Smertenko, A. , Bozhkov, P.V. (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *Journal of experimental botany* 65(5):1343-1360.
- Smith, D.L. , Krikorian, A.D. (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Reports* 9(1):34-37.
- Snow, N. , MacDougal, J.M. (1993) New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). *Systematic Botany*:261-273.
- Stasolla, C. , Yeung, E.C. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74(1):15-35.

- Steiner, N., Farias-Soares, F.L., Schmidt, É.C., Pereira, M.L., Scheid, B., Rogge-Renner, G.D., Bouzon, Z.L., Schmidt, D., Maldonado, S., Guerra, M.P. (2016) Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* Bert. O. Kuntze. *Protoplasma* 253(2):487-501.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J.B., Balbuena, T.S., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.I., Silveira, V. (2008) *Araucaria angustifolia* biotechnology. *Functional Plant Science and Biotechnology* 2(1):20-28.
- Storey, W.B. (1950) Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii.
- Svobodová, H., Albrechtová, J., Kumstýřová, L., Lipavská, H., Vágner, M., Vondráková, Z. (1999) Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(3):209-221.
- Tautorus, T., Fowke, L., Dunstan, D. (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany* 69(9):1873-1899.
- Thomas, T.L. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *The Plant Cell* 5(10):1401.
- Thorpe, T.A. (1990) The current status of plant tissue culture Developments in crop science. Elsevier, vol 19, p. 1-33.
- Thorpe, T.A. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology* 37(2):169-180.
- Thorpe, T.A., Stasolla, C. (2001) Somatic embryogenesis Current trends in the embryology of angiosperms. Springer, p. 279-336.
- Ulmer, T., MacDougal, J.M., Ulmer, B. (2004) *Passiflora: passionflowers of the world. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus.. ISBN 881926485*
- Vale, E.M., Heringer, A.S., Barroso, T., da Silva Ferreira, A.T., da Costa, M.N., Perales, J.E.A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2014) Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome science* 12(1):37.

- Vale, E.M., Reis, R.S., Passamani, L.Z., Santa-Catarina, C. , Silveira, V. (2018) Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*:1-11.
- Vasil, I.K. (1994) Automation of plant propagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*(105):105-108.
- Vasil, I.K. (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27(9):1423-1440.
- Verdeil, J.-L., Alemanno, L., Niemenak, N. , Tranbarger, T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in plant science* 12(6):245-252.
- Viana, A.P., Gonçalves, G.M., Silva, M.G.d.M., Ferreira, R.T., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T.d. , Carvalho, G.F.d. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16(3):250-253.
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., SOUZA, M.d., Maldonado, J.F.M. , Amaral Júnior, A.d. (2003) Simple and canonic correlation between agronomical and fruit quality traits in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 3(2):133-140.
- Vieira, L.M., Rocha, D.I., Taquetti, M.F., da Silva, L.C., de Campos, J.M.S., Viccini, L.F. , Otoni, W.C. (2014) *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50(6):738-745.
- von Aderkas, P. , Bonga, J.M. (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20(14):921-928.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. , Filonova, L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(3):233-249.

- Walker, D.R. , Parrott, W.A. (2001) Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64(1):55-62.
- Wang, Q.-M. , Wang, L. (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports* 31(9):1535-1547.
- Yang, X. , Zhang, X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science* 29(1):36-57.
- Zegzouti, R., Arnould, M.-F. , Favre, J.-M. (2001) Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. *Annals of forest science* 58(6):681-690.
- Zeng, F., Zhang, X., Cheng, L., Hu, L., Zhu, L., Cao, J. , Guo, X. (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90(5):620-628.
- Zerbini, F.M., Otoni, W.C. , Vieira, M.L.C. (2008) Passion fruit. *Compendium of Transgenic Crop Plants*:214-233.
- Zimmerman, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5(10):1411.