



# ORGANOGENESE DE *Passiflora edulis* Sims POR MEIO DA TÉCNICA TCL (*THIN CELL LAYER*)

## ORGANOGENESIS OF *Passiflora edulis* Sims USING THE TCL TECHNIQUE (THIN CELL LAYER)

Elias da Cruz Ribeiro<sup>1</sup>; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso<sup>2</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado, Manaus – Amazonas, CEP: 69080-900. Brasil. [elias.cruz9628@gmail.com](mailto:elias.cruz9628@gmail.com). <sup>2</sup> Pós-doutoranda CNPq/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte, Brasília - Distrito Federal, CEP: 70770-917. Brasil. [inaemarie@hotmail.com](mailto:inaemarie@hotmail.com). <sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte, Brasília - Distrito Federal, CEP: 70770-917. Brasil. [jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br).

### INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujá tem crescido ao longo dos anos, tanto nacional como internacionalmente. No Brasil, ocorrem cerca de 150 espécies distribuídas em quatro gêneros, sendo *Passiflora edulis* Sims e *P. alata* as mais cultivadas nacional e mundialmente (BERNACCI, 2003; JUNQUEIRA et al., 2005). A espécie *P. edulis* é a mais utilizada para produção de fruto, concentrando a maior parte dos estudos que visam melhorar a produtividade (MELETTI, 2011). No entanto, outras espécies possuem características de interesse, com propriedades medicinais cientificamente reconhecidas. Dentre elas, cita-se a *P. foetida*, a qual apresenta ação antibacteriana (MOHANASUNDARI et al., 2007).

O cultivo *in vitro* do maracujazeiro tem sido aplicado como alternativa para multiplicação de material livre de patógeno e, apesar de teoricamente possível, a multiplicação de material *in vitro* ainda carece de resultados para ser aplicado em escala comercial (PRAMMANEE et al., 2011).

Dentre as diversas técnicas que podem ser aplicadas *in vitro*, a *Thin Cell Layer* (TCL) se destaca pela sua aplicabilidade diversa (NHUT et al., 2003). Pode ser aplicada para obtenção de embriões, brotações, raízes, entre outros (SILVA; FUKAI, 2003). Pode permitir maior controle de fatores que influenciam as respostas morfogênicas (NHUT et al., 2003). A técnica pode ser classificada conforme o corte realizado, transversalmente (tTCL) ou longitudinalmente (ITCL), com particularidades em relação aos tipos de células presentes em cada corte (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2013). A técnica é pouco documentada no cultivo *in vitro* de maracujazeiro. Nhut et al. (2007) testaram a ação de diversos reguladores em explantes de *P. edulis* com espessura de 1mm e indicaram a concentração de 4,45 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP) como a melhor para regeneração de brotos.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização da técnica tTCL para propagação *in vitro* de genótipos de *Passiflora edulis*. Adicionalmente, o acompanhamento morfoanatômico do processo foi determinado.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. Foram utilizadas camadas finas seccionadas de segmentos internodais de maracujazeiros (*Passiflora edulis* Sims), provenientes de cinco genótipos: CPMSC1,



CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR. O material foi proveniente da Embrapa Produtos e Mercado, situada em Riacho Fundo II, Brasília, DF.

Em laboratório, brotos coletados foram reduzidos a microestacas de aproximadamente 3 cm e tiveram todas as folhas retiradas, deixando apenas uma gema lateral em cada microestaca. Posteriormente, as estacas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (1% de cloro ativo) e 3 gotas de Tween-20 por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

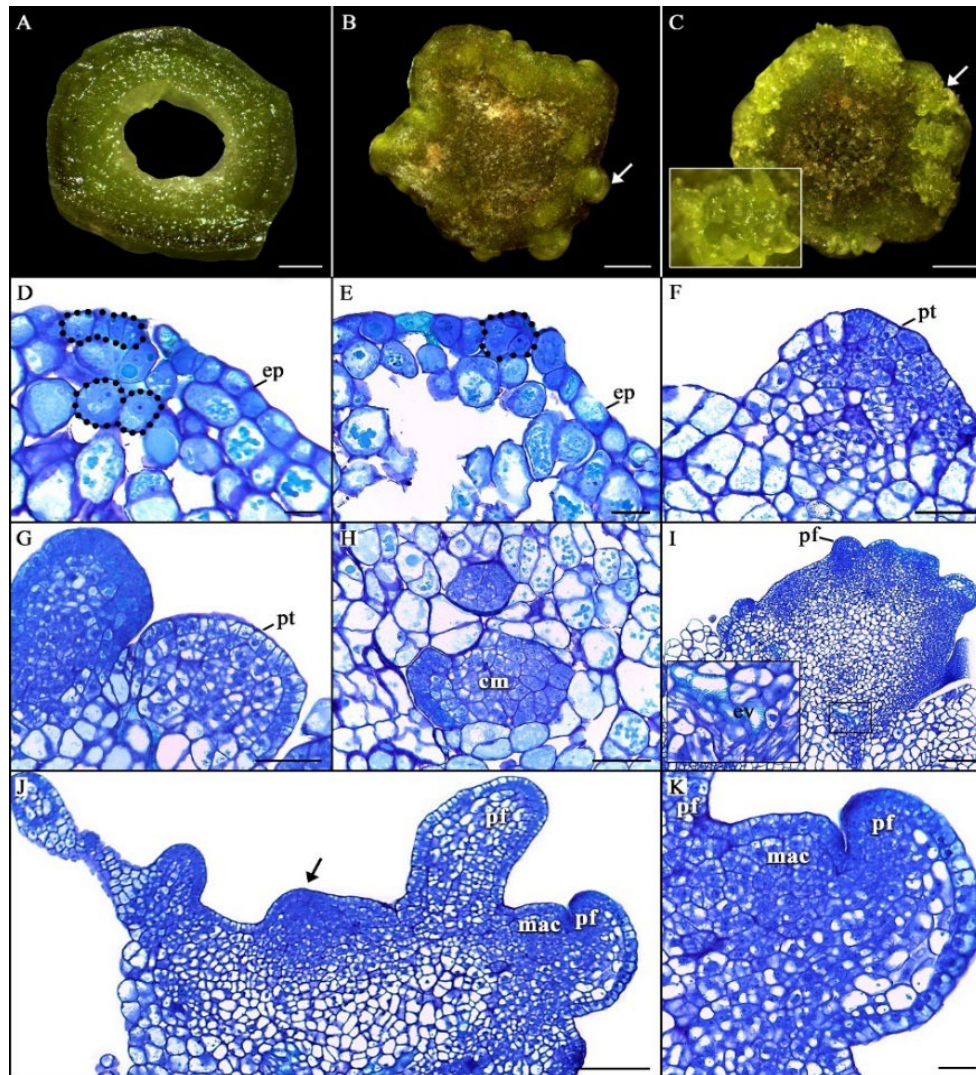
Com o auxílio de pinça e bisturi as microestacas foram seccionadas transversalmente em segmentos internodais com cerca de 1-2 mm de espessura (Figura 1 A). Os explantes foram inoculadas imediatamente em placas de Petri com meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 4,45 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP), conforme Nhut et al. (2007). Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g.L<sup>-1</sup> de *Phytigel*® (SIGMA).

O material foi mantido na ausência de luz durante 7 dias, à 25±2 °C. Após esse período, os explantes foram levados para sala crescimento sob condições de 16 h de fotoperíodo. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos (genótipos), com 3 repetições cada, sendo 20 explantes por repetição (placa). Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto formação de brotações adventícias e formação de calo.

Para a análise morfoanatômica foram selecionadas explantes com brotações adventícias com 30 dias de cultivo. Os processos de fixação, desidratação e infiltração das amostras foram realizados conforme Silva-Cardoso et al. (2019). Cortes de 3 a 5 µm foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica® RM2125RT), distendidos em chapa aquecedora à 45 °C e aderidos às lâminas microscópicas. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (1%) (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 10 dias de cultivo, observou-se intumescimento da maioria dos explantes de todos os genótipos (Figura 1 B). Após 20 dias de cultivo, verificou-se a formação de brotações adventícias na maioria dos genótipos, com exceção do CPMSC1. Porém, ao final de 30 dias de cultivo todos os genótipos apresentaram pelo menos um explante com brotações adventícias (Figura 1C). A análise dos resultados não demonstrou diferenças estatísticas entres os genótipos em relação à formação de brotações e calos, com valores médios de 5,8%, 61%, respectivamente.



**FIGURA 1** - Aspectos morfoanatômicos da organogênese a partir de explantes internodais de *Passiflora edulis* seccionados de acordo com a técnica *Thin Cell Layer* (TCL). A: Explante internodal imediatamente antes do cultivo. B: Explante internodal intumescido após 10 dias de cultivo; observar protuberâncias (seta). C: Explante com gemas adventícias (seta) após 20 dias de cultivo. D: Segmento foliar com células epidérmicas e subepidérmicas com características meristemáticas (pontilhado). E: Divisões em células epidérmicas (pontilhado). F, G: Protuberâncias oriundas de divisões de células periféricas do explante. H: Centros meristemáticos na região interna do explante. I: Brotação adventícia em formação; notar conexão vascular na região inferior (retângulos). J, K: Secção anatômica evidenciando protuberância (seta) e gema adventícia com primórdios foliares e meristema apical caulinar evidentes. K: Detalhe de primórdio foliar e meristema apical caulinar. Abreviações: (cm) centro meristemático, (ep) epiderme, (ev) elemento de vaso, (mac) meristema apical caulinar, (pf) primórdio foliar e (pt) protuberância. Barras = A: 0,5 mm; B, C: 1 mm, D, E, K: 0,025 mm, F-H: 0,05 mm e I, J: 0,1 mm.

Nhut et al. (2007) testaram diferentes reguladores de crescimento e obtiveram 100% de regeneração de brotos de *P. edulis* em meio de MS acrescido de 4,45  $\mu$ M de BAP, obtendo formações semelhantes às obtidas neste estudo (Figura 1C). Estudos com TCL reportaram altas porcentagens de brotação nos explantes. Silva e Fukai (2003), por exemplo, testaram a influência de diversos reguladores de crescimento em Crisântemo (*Dendranthema grandiflorum*), obtendo 82% de explantes com brotação em meio de MS acrescido de 4,45  $\mu$ M de BAP.



A espessura do corte utilizada neste estudo (1-2 mm) pode ter influenciado na baixa porcentagem de brotações obtidas. Estudos realizados por Nhut et al. (2001) demonstraram a importância da espessura do explante, obtendo-se maior taxa de brotações e de explantes vivos com corte de espessura entre 3 – 4 mm. Na maioria dos trabalhos com uso da técnica TCL, a ocorrência de calos é recorrente (NHUT et al., 2001; SILVA; FUKAI, 2003), o que pode estar relacionado ao próprio estresse ocasionado pelo seccionamento do explante, além da resposta ao regulador de crescimento utilizado, ou mesmo, às condições de cultivo.

As análises morfoanatômicas revelaram o envolvimento de células epidérmicas e subepidérmicas dos explantes com a formação de brotações adventícias (Figura 1 D-K). Essas células adquiriram características meristemáticas, como núcleos e nucléolos evidentes e alta relação núcleo/citoplasma (VERDEIL et al., 2007) (Figura 1D, E) e dividiram-se formando protuberâncias (Figura 1F, G), similares aquelas reportadas por Fernando et al. (2007), das quais as gemas adventícias foram originadas. Salienta-se que as gemas se desenvolveram preferencialmente sobre a parte superior do explante, a qual não apresentava contato direto com o meio de cultura, assim como mencionado por Rocha, Monte-Bello e Dornelas (2015).

Verificou-se também conexão vascular entre as gemas formadas e o explante de origem (Figura 1I), confirmando a ocorrência da rota organogênica. Essa rota é considerada predominante em *Passiflora* spp (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; FERNANDO et al., 2007 ). As brotações obtidas apresentavam meristema apical e primórdios foliares evidentes (Figura 1J, K).

## CONCLUSÕES

A técnica tTCL pode ser utilizada para multiplicação dos genótipos de *Passiflora edulis* estudados. Porém, faz-se necessário mais estudos analisando outros fatores que podem contribuir para aumentar as taxas de formação de brotos, como espessura dos cortes e necessidade de suplementação do meio de cultura com outros reguladores de crescimento em concentrações otimizadas

## REFERÊNCIAS

- BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Holanda, v. 79, n. 1, p. 87–90, 2004.
- BERNACCI, L. C. Passifloraceae. Em: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETT, A. M.; KIRIZAWA, M (Eds). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, 2003. v. 3p. 247–274.
- FERNANDO, J. A; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: The case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Suíça, v. 91, n. 1, p. 37–44, 2007.
- UNQUEIRA, N. T. V; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.).



- Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético.** 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81–92.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 83–91, out. 2011.
- MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. a common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 6, n. 23, p. 2650–2653, 31 dez. 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.
- NHUT, D. T.; VAN LE, B.; TANAKA, M.; TRAN THANH VAN, K. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum*. **Scientia Horticulturae**, Holanda, v. 87, n. 1–2, p. 131–138, 2001.
- NHUT, D. T.; SILVA, J. A. T.; VAN LE, B.; T.; TRAN THANH VAN, K. Thin cell layer studies of vegetable, leguminous and medicinal plants. Em: NHUT, D. T.; VAN LE, B.; TRAN THANH VAN, K.; THORPE, T (Eds.). **Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applicattions**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 387–425.
- NHUT, D. T; KHIET, B.L.T.; THI, N.N.; THUY, D.T.T.; DUY, N.; HAI, N.T.; HUYEN, P.X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) via Thin Cell Layer (TCL) technology. Em: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Eds.). **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**, Dordrecht: Springer, 2007. p. 417–426.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Áustria, v. 59, p. 368–373, jun. 1964.
- PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, Reino Unido, v. 30, n. 11, p. 1425–1429, nov. 2011.
- ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. 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**, Holanda, v. 120, n. 3, p. 1087–1098, 2015.
- SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 19, n. 4, p. 444–450, 2019.
- SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration. **Journal of Plant Growth Regulation**, Nova Iorque, v. 32, n. 4, p. 922–943, 2013.
- SILVA, J. A. T.; FUKAI, S. Chrysanthemum Organogenesis Through Thin Cell Layer Technology and Plant Growth Regulator Control. **Asian Journal of Plant Sciences**, Paquistão, v. 2, n. 6, p. 505–514, 1 jun. 2003.
- VERDEIL, J. L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, Holanda, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007.