

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

MARCELO DIAS MACHADO

**Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas
triploides de *Passiflora cincinnata* Mast**

**TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO - BRASIL
MARÇO - 2020**

MARCELO DIAS MACHADO

Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO “Carlos Alberto Reyes Maldonado” - UNEMAT, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho.

Coorientadores: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho

Prof. Dr. Diego Ismael Rocha

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO – BRASIL
MARÇO - 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Luiz Kenji Umeno Alencar CRB 1/2037

M149r MACHADO, Marcelo Dias.
Regeneração In Vitro, Caracteres Morfoagronômicos e Enzimáticos de Plantas Triploides de Passiflora Cincinnata Mast / Marcelo Dias Machado - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2020.

102 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2020.

Orientador: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientador: Ilio Fealho de Carvalho

1. Triploide. 2. Tecido Endospermico. 3. Enzimas de Resistência. 4. Passiflora Cincinnata. I. Marcelo Dias Machado. II. Regeneração In Vitro, Caracteres Morfoagronômicos e Enzimáticos de Plantas Triploides de Passiflora Cincinnata Mast:

.

CDU 631.52

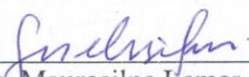
Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast

MARCELO DIAS MACHADO

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Carlos Alberto Reyes Maldonado, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 05 de Março de 2020

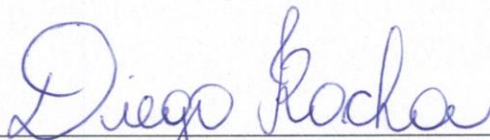
Comissão Examinadora



Prof. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho
Orientadora - UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos
Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho
Coorientador - UNEMAT - Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto
Reyes Maldonado



Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Coorientador - UFJ - Universidade Federal de Jataí

*A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus.
Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem
compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço
claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.*

Galileu Galilei

À Jesus misericordioso, à Nossa Senhora de Fátima, por toda proteção,
OFEREÇO

*Aos meus pais, Aparecida e João, à minha irmã Jaqueline, à minha filha Alana, pelo
amor absoluto, sem esperar nada em troca.*
*À minha orientadora, Dra. Maurecilne Lemes da Silva, ao Profº. Dr. Ilio Fealho de
Carvalho, pelas suas valiosas orientações e ensinamentos,*
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por nunca ter me abandonando, por tudo que me proporcionou, pela capacidade de resolver os problemas e por transformar as dificuldades em lição de vida. Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças.

Aos meus pais, Aparecida Alves Dias e João José Machado, a minha irmã, Jaqueline, a minha linda e amada filha, Alana, ao meu cunhado, Joaquim, meus avós, Sebastião e Maria, aos meus tios Carlos e Paulo, minhas tias Rose, Rosa e Lúcia, meus sobrinhos, Joaquim Raphaell, Anna Beatriz e João Miguel: minha FAMÍLIA. Deus me dá motivos para agradecer todos os dias, mas nenhum é maior que a família linda que Ele escolheu para mim. Obrigado por me incentivarem em todos os momentos da minha vida, por confiarem em mim, por fazerem possível o meu desejo de estudar e por me ajudarem a realizar meus sonhos.

Minha gratidão especial a minha amiga e orientadora, Professora Dra. Maurecilne Lemes da Silva. Professora, obrigado por teus ensinamentos, pela sua disponibilidade e dedicação, mesmo em período de férias, para realizar e prosseguir com este trabalho. Acima de tudo, obrigado por sua compreensão. A senhora é exemplo de profissional e mais ainda de ser humano. Sem a sua profunda participação não seria possível a realização do nosso trabalho. Acima de tudo, obrigado por toda confiança dedicada a mim. Obrigado por sua valiosa amizade.

Ao meu amigo e coorientador, Professor Doutor Ilio Fealho de Carvalho. Sou grato por ter me oferecido todo o suporte necessário, por ouvir pacientemente minhas opiniões, pelos momentos de descontração dos “Chopps” e acima de tudo pela amizade. Reforço o apoio incondicional prestado nos teus períodos de férias, a forma interessada e relevante como acompanhou a realização deste trabalho. Pela presença e pela importância que teve, tem e sempre terá minha admiração.

Agradeço ao meu coorientador, Doutor Diego Ismael Rocha, por aceitar o convite, por ceder uma parte do seu tempo na contribuição do nosso trabalho e por toda a paciência contida para a entrega do trabalho. Grande abraço, professor.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA-MT), pelo apoio institucional concedido, sendo possível a realização do mestrado.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica durante o mestrado.

Pela equipe e colegas de trabalho do Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal: Nayara, Claudinei, Wolffe, Inaria e Ednan. Muito obrigado a todos pelos valiosos apoios prestados para a execução dos experimentos no laboratório e na casa de vegetação. Deus os abençoe. Esse resultado só foi possível devido a colaboração de todos vocês.

Gratidão, em especial, aos meus amigos Lucas Fernando e Claudinei que não mediram esforços para auxiliar na coleta dos dados e realização das atividades de campo. O que é o ser humano sem a amizade? Contem comigo. Muito obrigado, muito obrigado.

Ao Dr. Elyabe e Dra. Aryane pela contribuição e realização das análises de citometria de fluxo e viabilidade polínica. Grande abraço e obrigado.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia pela colaboração durante o desenvolvimento da pesquisa, em especial a Evillyn Jacinto Tofanelli e Adrielly Vieira, pela ajuda prestada.

À equipe técnica do CPEDA que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial ao “seu” Edilson.

À amizade que se formou na turma, João e Dhielida. Que Deus abençoe vocês meus amigos e que alcancem vossos objetivos. Força e fé para prosseguirem nesta jornada de vida.

Aos meus amigos Júnior e Rogério que cederam um lugar para morar no início do curso e pelo apoio prestado ao longo da minha residência em Tangará da Serra.

À amizade formada durante a estadia em Tangará da Serra: Karol Novak, Maria Eduarda “Duda”, Renata, Vitória e Chellis por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos que precisei. Vem o tempo, à distância e as obrigações, mas nada apaga o que vivemos. Deus abençoe imensamente a vida de vocês.

À todos os meus colegas e amigos não citados, mas não esquecidos, o meu muito obrigado pelo apoio.

Muito obrigado, pessoal!

BIOGRAFIA

MARCELO DIAS MACHADO, filho de João José Machado e Aparecida Alves Dias, nasceu do dia 14 de julho de 1987, em Colorado do Oeste, Rondônia.

Em setembro de 2005, ingressou no Curso de Agronomia, na Universidade do Estado de Mato Grosso, *campus* de Cáceres-MT graduando-se como Bacharel em Agronomia em setembro de 2010.

Em março de 2018, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais. Em 05 de março 2020, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Gênero <i>Passiflora</i> : potencial ornamental	3
2.2 Espécie <i>Passiflora cincinnata</i> Mast	4
2.3 Cultura de tecidos no gênero <i>Passiflora</i>	5
2.4 Descritores morfoagronômicos	5
2.5 Enzimas oxidativas e lítica de resistência	6
2.6 Proteína total	6
2.7 Indução de resistência por bioestimulantes	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO I - O endosperma na produção de plantas triploides ornamentais e frutíferas – revisão geral	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. Cultivo in vitro de endosperma em plantas ornamentais e frutíferas	23
2.1 Plantas triploides	23
3. Alterações morfofisiológicas em plantas triploides	24
3.1 Fertilidade reduzida	24
3.2 Alterações morfológicas	26
3.3 Desenvolvimento estomático: fator responsável pela maior resistência ao estresse hídrico	28
3.4 Alterações químicas: aumento da tolerância e resistência a fatores bióticos e abióticos em plantas triploides	29
4. Perspectivas no melhoramento genético de plantas triploides	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO II - Regeneração in vitro e caracterização morfoagronômica em plantas triploides de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	43
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Material vegetal e indução da embriogênese somática	45
2.2 Conversão das plantas e aclimatização	46
2.3 Determinação do conteúdo de DNA	46
2.4 Análise cromossômica	47

2.5 Caracterização morfoagronômica.....	47
2.6 Análise da viabilidade polínica	52
3. RESULTADOS	53
3.1 Regeneração in vitro do tecido endospermico e confirmação da triploidia	53
3.2 Caracterização morfoagronômica de plantas triploides	56
3.3 Viabilidade polínica.....	65
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO III - Comportamento de plantas triploides de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. induzidas por biostimulantes <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Bacillus subtilis</i> na produção de enzimas oxidativas e lítica.....	80
1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1 Obtenção material vegetal	82
2.1.1. Plantas triploides	82
2.2 Ensaio in vitro.....	83
2.2.1 Obtenção dos micro-organismos	83
2.2.2 Ensaio in vivo	83
2.2.3 Delineamento experimental e tratamentos	83
2.2.4 Aplicação dos indutores de resistência.....	84
2.3 Determinação da atividade da enzimática	84
2.3.1 Coleta das amostras	84
2.3.2 Atividade de peroxidases.....	84
2.3.3 Atividade de polifenoloxidasas	85
2.3.4 Atividade de β -1,3-glucanases	85
2.3.5 Determinação da proteína total.....	86
3. RESULTADOS	86
4. DISCUSSÃO	91
5. CONCLUSÕES.....	93
6. APÊNDICE	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8. CONCLUSÕES GERAIS	102

RESUMO

MACHADO, Marcelo Dias. M. Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso. Março de 2020. **Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast.** Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientadores: Prof^o. Dr. Ilio Fealho de Carvalho e Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.

O objetivo geral do trabalho foi a produção in vitro a partir da embriogênese somática com o uso do endosperma, caracterização morfoagronômica e a avaliação do comportamento das plantas triploides na produção de enzimas de resistência em *Passiflora cincinnata*. Para a produção de plantas triploides via embriogênese somática utilizou-se endosperma maduro da semente de *P. cincinnata*. A maior média de produção de embriões somáticos foi observada no tratamento suplementado com 18,1 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, com número médio de nove embriões por explante aos 30 dias de cultivo. Plântulas triploides regeneradas in vitro aos 45 dias foram cultivadas em casa de vegetação e o nível de ploidia confirmada com quantidade de DNA de 4,38 pg e número cromossômico $3n = 3x = 27$ e os diploides com ($2n = 2x = 18$). O florescimento das plantas triploides ocorreu aos 210 de cultivo e apresentaram alta variabilidade na expressão fenotípica devido a variabilidade genética proporcionada pelo aumento na ploidia. Plantas diploides e triploides apresentaram polimorfismo (77%) nos descritores morfoagronômicos. As plantas triploides exibiram folhas heteromorfas, de tonalidades mais escura, predominantemente trilobadas com maior tamanho e largura. As flores foram maiores, mais escuras e intensas, com predominância de coloração roxa. A diversidade de flores encontradas nas plantas triploides, sete variações, sugere que a adição de ploidia provocou alterações na expressão dos genes e induziu a ocorrência de colorações fenotipicamente variadas das flores, melhorando os atributos ornamentais da espécie. O diâmetro interno e externo da cavidade da corona aumentou significativamente nas plantas triploides. Dados da análise polínica indicam que as espécies diploides e triploides apresentam alta taxa de viabilidade polínica, 98,21 e 97,82%, respectivamente. Foram observadas variações fisiológicas na produção das enzimas oxidativas (peroxidase e polifenoloxidase) e hidrolítica (β -1,3-glucanase) nas plantas triploides de *P. cincinnata*. O aumento da ploidia afetou significativamente a atividade das enzimas envolvidas na resistência de plantas. As rizobactérias promotoras

de crescimento em plantas, *A. brasilense* e *B. subtilis*, foram eficazes na ativação das enzimas relacionadas aos mecanismos de resistência e defesa vegetal nas plantas diploides e triploides. *A. brasilense* proporcionou os maiores valores na indução das atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e *B. subtilis* induziu maior atividade de β -1,3-glucanase. A capacidade de resposta aos mecanismos de defesa das plantas triploides produzidas in vitro com o uso do endosperma de *P. cincinnata* e a indução dos bioestimulantes na produção de enzimas de resistência, abrem novas abordagens no melhoramento genético para o gênero.

Palavras-chave: Triploide, tecido endospermico, enzimas de resistência, *Passiflora cincinnata*

ABSTRACT

MACHADO, Marcelo Dias. M. Sc. State University of Mato Grosso. March of 2020. **In vitro regeneration, morpho-agronomic and enzymatic traits of *Passiflora cincinnata* Mast triploid plants.** Advisor: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, Co-Advisor: Ilio Fealho de Carvalho, Co-Advisor and Diego Ismael Rocha.

The general objective of the work was the in vitro production from somatic embryogenesis using the endosperm, morpho-agronomic characterization and evaluation of the behavior of triploid plants in the production of resistance enzymes in *Passiflora cincinnata*. For the production of triploid plants via somatic embryogenesis, mature endosperm from the seed of *P. cincinnata* is used. The highest average of somatic embryo production was observed in the supplementation treatment with 18.1 μM of 2.4-D + 4.5 μM of BA, with an average number of nine embryos per explant at 30 days of culture. Seedlings regenerated in vitro for 45 days were grown at home and a confirmed ploidy level with a DNA amount of 4.38 pg and chromosome number $3n = 3x = 27$ and the respective diploids ($2n = 2x = 18$). The flowering of the triploid plants occurred at 210 of cultivation and showed high variability in phenotypic expression due to the genetic variability provided by the increase in ploidy. Diploid and triploid plants described polymorphism (77%) in the morpho-agronomic descriptors. As the triploid plants exhibit heteromorphic leaves, predominantly trilobed with larger size and darker tonal width. The flowers were bigger, darker and more intense, with a predominance of purple color. The diversity of flowers found in triple plants, seven changes, suggests that the addition of ploidy causes changes in the expression of genes and causes the occurrence of phenotypically variable colorings of flowers, improving the ornate patterns of the species. The internal and external diameter of the crown cavity increased in the triploid plants. Pollen analysis data show that diploid and triploid species have high rates of pollen viability, 98.21 and 97.82%, respectively. Physiological changes in the production of oxidative (peroxidase and polyphenol oxidase) and hydrolytic (β -1,3-glucanase) enzymes were observed in the triploid plants of *P. cincinnata*. The increase in ploidy affected the activity of enzymes used in plant resistance. As plant growth-promoting rhizobacteria, *A. brasilense* and *B. subtilis*, were used in the activation of enzymes related to the resistance and plant defense mechanisms in diploid and triploid

plants. *A. brasilense* provided the highest values of activity induction of the enzymes peroxidase and polyphenol oxity and *B. subtilis* induced greater activity of β -1,3-glucanases in *P. cincinnata*. The ability to respond to the defense mechanisms of triploid plants produced in vitro with the use of *P. cincinnata* endosperm and the induction of biostimulants in the production of resistance enzymes, opens new approaches in the genetic improvement for the genus.

Keywords: Triploid, endosperm tissue, resistance enzymes, *Passiflora cincinnata*

1. INTRODUÇÃO GERAL

O maracujá é um fruto da família das Passifloraceae, organizada em 20 gêneros, onde o gênero *Passiflora* é o maior representante da família, com cerca de 630 espécies e 400 híbridos artificiais, das quais 150 a 200 espécies são nativas do Brasil. (Peixoto, 2005; Cervi, 2006; Amorim et al., 2013). Destas, aproximadamente 70 espécies produzem frutos comestíveis (Faleiro et al., 2005), e diversas espécies silvestres tem potencial ornamental (Silva et al., 2015; Faria et al.; 2018; Mikovski, 2019).

As espécies silvestres apresentam alta variabilidade genética e morfológica que podem ser exploradas em programas de melhoramento genético (Viana et al., 2010). Se destacam pelo potencial ornamental, com diversidade de flores e folhas. Apesar disso, pouco se conhece deste potencial ornamental, podendo usá-las para fins econômicos no paisagismo de pequenas e grandes áreas (Junqueira; Junqueira, 2006). *Passiflora cincinnata* Mast. é uma planta silvestre que apresenta múltiplas finalidades. Pode ser explorada comercialmente no consumo de in natura e de suco, flores para ornamentação e matéria-prima para indústria farmacêutica (Bernacci et al., 2005), além de poder ser usado como porta enxerto para espécies comerciais, por apresentar resistência a doença bacteriana *Xanthomonas campestris* f. sp. *Passiflorae* e a nematoide (*Meloidogyne* sp) (Viana et al., 2010; Alexandre et al., 2013).

As espécies diploides ($2n=12$ ou 18) predomina no gênero, mas, pode-se encontrar espécies tetraploides ($2n=24$), hexaplóides ($2n=36$) e octoplóides ($2n=72$) (Melo; Guerra, 2003). Motivados pela superioridade agrônômica dos poliploides naturais, diversos trabalhos têm sido realizados a fim de desenvolver meios para indução artificial de poliploides. Uma das formas de obtenção do triploide ($3n$) é pelo cultivo do endosperma, que é um tecido triploide natural proveniente da fusão de três núcleos haploides (Sun et al., 2011). Mohamed et al. (1996) foram os precursores dentro do gênero *Passiflora*, usando a espécie *P. foetida*. Estudos recentes com espécies de *Passiflora* foram realizados por Antoniazzi et al. (2018), em *P. edulis*, e Faria et al. (2018) em *P. cristalina*, onde demonstraram a capacidade do tecido do endosperma de produzir plantas triploides.

A planta triploide apresenta desbalanceamento no número de cromossomos durante a meiose, causando esterilidade das sementes e abortamento de frutos (Aleza et al., 2010). Esta esterilidade é indesejável quando as sementes são usadas comercialmente. No entanto, a esterilidade de sementes aumenta a qualidade fisiológica em várias frutas como a uva, mamão, maçã, melancia, banana e citros (Thomas; Chaturvedi, 2008; Hoshiro et al., 2011; Whang et al., 2016). Os triploides apresentam maior vigor que os diploides, com crescimento vegetativo acelerado, ganhos em biomassa e maior resistência a doenças. (Thomas; Chaturvedi, 2008; Wang et al., 2016). Apresentam folhas mais espessas e compridas, com coloração verde escura e maior capacidade fotossintética. As flores são mais coloridas, com período de floração prolongado e os frutos são maiores (Padoan et al., 2013; Mondal, 2014;).

Estes incrementos nos órgãos vegetativos e reprodutivos (efeito “gigas”) ocorre porque há economia de energia fotossintética ao não produzir sementes e frutos, revertendo-a para o crescimento vegetativo, modificando as estruturas morfológicas da nova planta (Hoshiro et al., 2011). Os descritores morfoagronômicos tem papel fundamental na caracterização e seleção de plantas, contribuindo no processo de diferenciação fenotípica (Jesus et al., 2015), permitindo analisar a variabilidade genética em caracteres fundamentais, colaborando para o desenvolvimento de novos materiais.

A adição extra de cromossomo altera a composição química das plantas, destacando as enzimas envolvidas na indução de resistência. Inclui-se neste grupo as enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β -glucanase, classificadas por Van Loon e Van Strien (1999) como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR). A peroxidase e polifenoloxidase atuam na cicatrização de ferimentos e defesa de patógenos e a β -1,3 glucanase tem caráter antifúngico, atuando na deterioração da estrutura micelial dos fungos, dificultando ou impedindo sua ação patogênica (Higaki; Araujo, 2012; Bulegon et al., 2016; Lastochkina et al., 2019).

O uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*, têm desempenhado ação sinalizadora de defesa das plantas contra patógenos por promover a resistência sistêmica induzida (RSI) ao induzir a ativação de proteínas relacionadas à patogênese, principalmente as

oxidativas (peroxidase e polifenoloxidase) e a hidrolítica (β -1,3 glucanase) (Safi et al., 2016; Silva et al., 2018; Bulhães et al., 2019).

O trabalho teve como objetivo a regeneração *in vitro* através do cultivo do endosperma, avaliação dos caracteres morfoagronômicos e a quantificação enzimática de peroxidase, polifenoloxidase, β -glucanase e proteína total induzidas pela aplicação dos bioestimulantes *A. brasilense* e *B. subtilis* em plantas diploides e triploides de *Passiflora cincinnata* Mast.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Passiflora*: potencial ornamental

O gênero *Passiflora* possui distribuição pantropical e diversas espécies com potencial alimentício, ornamental e medicinal (Cervi, 2006; Souza; Lorenzi, 2012). O valor ornamental está relacionado com as variedades de flores e as formas diversificadas das folhas. As flores do maracujazeiro são exuberantes, com cores variadas e de perfume marcante (Abreu et al., 2009).

Estima-se que o uso de passifloras como planta ornamental iniciou-se em 1625, na Europa. Logo depois, em 1819, o inglês Thomas Milne obteve o primeiro híbrido ornamental, cruzando as espécies *P. caerulea* e *P. racemosa*, denominado *P. 'violacea'* (Peixoto, 2005). No Brasil, os trabalhos com *Passiflora* com finalidade exclusivamente ornamental começaram com a Embrapa Cerrados, lançando as primeiras cultivares híbridas: BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* x *P. setacea*), BRS Roseflora (Retocruzamento BRS Estrela do Cerrado x *P. setacea*) e BRS Rubiflora (retocruzamento entre BRS Estrela do Cerrado x *P. coccínea*) (Faleiro et al., 2009).

Em 2013, lançou a cultivar BRS Pérola do Cerrado (*P. setacea*). No ano de 2016 lançaram novas cultivares híbridas sendo a BRS Céu do Cerrado (*P. incarnata* X *P. edulis*) e BRS Rosea Púrpura (*P. incarnata* X (*P. quadrifaria* X *P. setacea*)) (Fonseca et al., 2017). Outros trabalhos com espécies nativas com potencial ornamental tem sido relatado, como em *P. mucronata* (Meletti et al., 2011), *P. morifolia*, *P. suberosa litoralis* e *P. palmeri* var. *sublanceolata* (Pires et al., 2012), *P. suberosa* (Marostega et al., 2015), *in vitro* nas espécies *P. cincinnata* (Silva et al., 2009; 2015; Silva et al., 2011), *P. miniata*

(Carvalho et al., 2017), *P. cristalina* (Faria et al., 2018) e na produção de híbridos, como a *P. 'Alva'*, *P. 'Aninha'* e *P. 'Priscila'* (Santos et al., 2012), BC₁ hybrids (Melo et al., 2016), HD26, HD27 (Souza, 2017), *P. 'Gabriela'* e *P. 'Bella'* (Belo et al., 2018) e HD 25 (Souza, 2018), registradas na Sociedade Internacional de *Passiflora*.

Híbridos obtidos recentemente, como a *P. 'Jhovis'* e *P. 'Vivis'* (Souza, 2018) e os híbridos triplos *P. 'leonel's* e *P. 'vittali'* (Sanchês, 2018), ainda não foram registrados, mas mostram a tendência da expansão de mercado para produção de *Passiflora* ornamental.

2.2 Espécie *Passiflora cincinnata* Mast

Chamado de maracujá-mochila ou maracujá-do-mato, *Passiflora cincinnata* têm maior abundância nos Estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais (Oliveira Júnior et al., 2010). Possui flores de coloração rosa pálido à violeta azul e sépalas oblongo-lanceoladas. Os filamentos da coroa são de coloração púrpura, azul-pálido e banda média azul-rosado, na parte inferior. Folhas são simples, 3 a 5 tripartidas, pálidas na fase abaxial e verde-escuras na fase adaxial e pecíolos com 2 a 3 glândulas sésseis. Frutos do tipo baga, ovóides e oblongos. As sementes são ovais, faveoladas e negras (Nunes; Queiroz, 2001; Araújo, 2007; Castro et al., 2014; Jesus et al., 2014; Nobrega et al., 2017; Fonseca et al., 2017).

P. cincinnata foi cultivada durante anos como planta ornamental na Europa, especialmente na Inglaterra (Vanderplanck, 2000). A espécie apresenta resistência ao nematoide *Meloidogyne* sp., a bactéria *Xanthomonas campestris* f. sp. *Passiflorae* e resistência moderada ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, sendo uma espécie de interesse para programas de melhoramento genético com potencial de uso como porta-enxerto na propagação do maracujá azedo (Oliveira; Ruggiero, 2005; Viana et al., 2010; Alexandre et al., 2013; Preisigke et al., 2017).

Em 2016, a Embrapa Cerrados lançou a cultivar BRS Sertão Forte, resultante de uma seleção massal de uma população de acessos silvestres da espécie *P. cincinnata*, caracterizada por apresentar maior tolerância ao estresse hídrico, maior tamanho de fruto e longo ciclo produtivo (Rybka et al., 2016).

2.3 Cultura de tecidos no gênero *Passiflora*

É uma importante ferramenta que induz o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas em meio artificial, sendo de grande potencialidade para utilização no melhoramento genético de plantas (Andrade, 2002), tornando-se um excelente meio para multiplicação de genótipos superiores com resistência às doenças e de alto desempenho (Dias et al., 2014). Isto ocorre devido a totipotência celular, que é a capacidade de uma única célula de se regenerar, produzindo órgãos (organogênese) ou embriões que formará um novo indivíduo (embriogênese somática), idêntico a matriz doadora (Xu; Huang et al., 2014).

O estabelecimento de plantas de maracujá *in vitro* ocorre através do cultivo de segmentos de tecidos vegetais, que podem ser ápice caulinar (Faria; Segura, 1997; Reis et al., 2003; Isutsa, 2004), cotilédone e hipocotiledonares (Dornelas; Vieira, 1994; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016; Faria et al., 2018), segmento nodal e foliar (Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Shekhawat et al., 2015), embrião zigótico (Guzzo et al., 2004; Silva et al., 2009; Rosa; Dornelas, 2012; Silva et al., 2015; Rocha et al., 2015; Carvalho et al., 2017; Faria et al., 2018), endosperma (Mohamed et al., 1996; Guzzo et al., 2004; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018).

2.4 Descritores morfoagronômicos

Os descritores morfoagronômicos são ferramentas fundamentais para estudar a diversidade genética dentro das espécies, individualizando fenotipicamente cada planta (Cruz; Carneiro, 2006). Araújo et al. (2008) e Machado et al. (2015), estudaram a diversidade existente entre as espécies silvestres de *Passiflora*, com base em caracteres quantitativos e qualitativos. Jesus et al. (2015), propuseram alguns ajustes aos descritores mínimos e elaboraram um manual, a fim de padronizar os descritores oficiais para *Passiflora* spp., incluindo as ornamentais e silvestres. Em 2016 o MAPA (Brasil, 2016) publicou um formulário que estabelece diretrizes para as avaliações, afim de uniformizar os descritores em cultivares de *Passiflora* ornamental, medicinal, frutífera e híbrido interespecífico.

Recentemente, Fonseca et al. (2017) validaram descritores morfoagronômicos por meio de caracterização de híbridos de maracujá ornamental. Outros autores

estudaram a caracterização da espécie *P. cincinnata*, utilizando de descritores agronômicos e morfoagronômicos (Nóbrega et al., 2017; Carmo et al., 2017)

2.5 Enzimas oxidativas e lítica de resistência

A peroxidase (POD) são enzimas de resistência pertencente ao grupo das oxidoredutases, responsáveis por participar em vários processos fisiológicos das plantas, como a cicatrização de ferimentos, defesa contra patógenos, reações de biossínteses da parede celular, na síntese de lignina, auxinas, regulação da elongação de células (Cavalcanti et al., 2005; Silva et al., 2016).

A polifenoloxidase (PPO) são enzimas capacitadas para oxidar compostos fenólicos com auxílio de oxigênio molecular. A atividade da PPO se faz presente em todos os estágios de desenvolvimento da planta, sendo encontrado nos cloroplastos e sua concentração é variável entre as espécies e cultivares e a localização na célula depende da espécie, maturidade e idade. Encontra-se em maior atividade quando a planta sofre injúria mecânica ou ataque microbiano e nos frutos mais jovens (Fatibello Filho; Vieira, 2002; Silva et al., 2016).

As enzimas β -glucanases presentes em plantas superiores, podem apresentar caráter antifúngico deteriorando a estrutura micelial, dificultando ou impedindo sua ação patogênica, bem como estão diretamente relacionadas à ativação das enzimas de resistência (Hong; Meng, 2003).

2.6 Proteína total

A proteína é formada via processos de transcrição e tradução, onde se deriva de um ou mais genes, e tem função de diferenciação celular, controle do crescimento, sustentação mecânica e catálise enzimática. Dentre estas funções, pode-se destacar a de mecanismo de defesa, onde é ativado próximo a área danificada, prevenindo o espargimento do patógeno ou, intentando deter o avanço da predação por insetos (Pascholati; Leite, 1995). Essas proteínas de defesa são codificadas por genes de plantas que buscam combater o patógeno. Elas são ativadas em resposta ao estímulo abiótico ou por infecção por um patógeno, agindo de forma direta, em contrapartida ao agente

agressor, ou de forma indireta, conservando a estrutura e as funções celulares (Stintizi et al., 1993; Ryan, 2000; Jones; Dangl, 2006)

2.7 Indução de resistência por bioestimulantes

A indução de resistência é um método ecológico e alternativo para controle de doenças de plantas, que envolve a ativação dos mecanismos latentes de defesa das plantas contra os patógenos, em resposta ao tratamento com indutores de resistência (Mattos Jr. et al., 2010; Lorenzetti et al., 2018), sem que haja alteração no genoma da planta (Baysal et al., 2003). Dentre os potenciais agentes indutores, têm sido avaliadas as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) (Silva et al., 2018).

A aplicação exógena das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* desempenham ação sinalizadora de defesa das plantas contra patógenos, aumentando o nível de resistência sistêmica, influenciando na redução dos sintomas de doenças em plantas e promovendo o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Prs) (Bulegon et al., 2016; Silva et al., 2018; Bulhães et al., 2019). As cepas de *Bacillus subtilis* possuem amplo espectro, promovendo efeito protetor a diversas espécies de plantas contra pragas, estresse salino, doenças de ciclo produtivo e de pós-colheita (García-Gutiérrez et al., 2013; Adam et al., 2014; Kim et al., 2015 Chandrasekaran; Chun, 2016; Kilani-Feki et al., 2016; Arroyave-Toroa et al., 2017; Lastochkina et al., 2017; Prabhukarthikeyan et al., 2017) Também há relatos de *Azospirillum brasilense* desencadeando resistência induzida, auxiliando no controle de doenças (Sankari et al., 2011), estresse hídrico (Bulegon et al., 2016) e estresse salino (Fasciglione et al., 2015).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v.166, p.307-315, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 635p., 1997.

ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C.; TIRADENTES, A. T.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.329-332, 2013.

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridizations and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Reports**, v.29, p.1023–1034, 2010.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA Cerrados, Planaltina-DF. Documento 58, p.14, 2002.

ANTONIAZZI, C. A.; FARIA, R. B.; CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; MATOS, E. M.; OTONI, W. C. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**, v.238, p.408-415, 2018.

AMORIM, F. L.; SILVEIRA, P. T. S.; SILVA, G. V.; CAFIEIRO, C. S. P. Elaboração e aceitação sensorial de licor maracujá-do-mato com diferentes tipos de calda. **Revista de Desenvolvimento e Inovação**, v.1, p.88- 91, 2013.

ARAÚJO, F. P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômica, 2007. 94p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 30, p.723-730, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 601 p.

BAYSAL, Ö.; LAI, D.; XU, H.H.; SIRAGUSA, M.; ÇALISKAN, M.; CARIMI, F.; SILVA, J. A. T.; TÖR, M. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. **Research Articles**, v.8, p.1-12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>

BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; LAVINSCKY, M. P. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. **Euphytica**, v.214, p.2, 2018.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; PASSOS, I. R. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Org.). **Maracujá:**

germoplasma e melhoramento genético. Planaltina - DF: EMBRAPA Cerrados, p. 559-586, 2005.

BITTAR, P. **Câmara aprova criação de política de incentivo à cultura de flores e plantas ornamentais.** Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/camaranoticias/radio/materias/RADIOAGENCIA/577112-CAMARA-APROVA-CRIACAO-DE-POLITICA-DE-INCENTIVO-A-CULTURA-DE-FLORES-E-PLANTASORNAMENTAIS.html> Acesso em: 29 de julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de cultivares. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de maracujá (*Passiflora* L. e híbridos específicos) exceto *Passiflora edulis* Sims.** 2016. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/arquivos-frutiferas/maracuja_formulario_23mai2016_passiflora_p.doc/@download/file/MARACUJA_FORMULARIO_23MAI2016_PASSIFLORA_P.doc . Acesso em 29 de julho de 2019.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, p.343-349, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v46a1489>

CARMO, T. V. B.; MARTINS, L. S. S.; MUSSER, R. S.; SILVA, M. M.; SANTOS, J. P. O. Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. **Revista Caatinga**, vol.30, p.68-77, 2017.

CARVALHO, P. P.; ANTONIAZZI, C. A.; SILVA, N. T.; MIKOSVKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; CARVALHO, M. L. S. Regeneração in vitro de *Passiflora miniata* Mast. **Ornamental Horticulture**, v.23, p.88-95, 2017.

CERVI, A. C. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summæ Editionem**, v.16, p.1-5, 2006

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: UFV, pag. 585, 2006.

DIAS, M. S. C.; PÁDUA, J. G.; SILVA, A. F.; LONDE, L. N.; REIS, J. B. R. S.; JESUS, A. M. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, p. 39-47, 2014.

DORNELAS, M. C. E.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, p.187-210, 2005.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. N. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. S.; ARAÚJO, S. C. B.; ANDRADE, S. R. M.; COSTA, A. M.; CASTELLEN, M. S.; VAZ, A. P. A.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ANDRADE G. A. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Livros e Cultivares Apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional – DF**. Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, p.45, 2009.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow Passionfruit by axillary bud proliferation. **Horticultural Science**, v.32, p.1276-1277, 1997.

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.54, p.166-174, 2018.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BARTH, M.; FELBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, p.849-860, 2017.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em sucos e geleias. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.172-177, 2008.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v.106, p.47–54, 2011.

GORJANOVIĆ, S. A Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, v.115, p.334-360, 2009.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, v.61, p.108-113. 2004.

HIGAKI, W. A.; ARAÚJO, F. F. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestado. **Nematropica**, v.42, p.1-12, 2012.

HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.1-8, 2011.

HONG, T. Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1, 3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp isolated from garden soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p.472-478, 2003.

HSU, S. Y.; KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

ISUTSA, D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v99, p.395-400, 2004.

JESUS, N. O.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; FALEIRO, F. G. **Aplicação de descritores morfoagronômicos utilizados em ensaios de DHE de cultivares de maracujazeiro-doce, ornamental, medicinal, incluindo espécies silvestres e híbridos interespecíficos (*Passiflora* spp): Manual prático**. Embrapa Cerrados, Brasília, 33p., 2015.

JONES, J. D. & DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies nativas do Cerrado com potencial ornamental. In: **Simpósio Internacional de Paisagismo**, 3, Lavras, MG. Palestras. Lavras: UFLA, p.49-54, 2006.

KILANI-FEKI, O.; KHEDHER, S. B.; DAMMAK., M.; KAMOUN, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control**, v.95, p.73-82, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.005>

LASTOCHKINA, O.; PUSENKOVA, L.; YULDASHEV, R.; BABAEV, M.; GARIPOVA, S.; BLAGOVA, D.; KHAIRULLIN, R.; ALINIAEIFARD, S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.121, p.80-88, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa**

Phytopathologica, v.44, p.45-50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/176895>

MACHADO, C. F.; JESUS, F. N.; LEDO, C. A. S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, p. 442-449, 2015.

MATTOS JR, D.; QUAGGIO, J. A.; BOARETTO, R. M. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, v.31, p.65-74, 2010.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.55-78. 2005.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; AZEVEDO FILHO, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.17, p.87-95, 2011.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45SrDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v.92, p.309–316, 2003.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SOUZA, V. O.; CORRÊIA, R. X. Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. **Scientia Horticulturae**, v.212, p.91-103, 2016.

MIKOVSKI, A. I; SILVA, N. T.; SOUZA, C. DA S.; MACHADO, M. D.; OTONI, W. C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**, v.25, p. 189-199, 2019.

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.161-164, 1996.

MONDAL, T. K. **Breeding and biotechnology of tea and its wild species**. Springer Science & Business Media, 2014.

MAROSTEGA, T. N.; CUIABANO, M. N.; RANZANI, R. E.; LUZ, P. B., SOBRINHO, S. P. Efeito do tratamento térmico na superação de dormência de sementes de *Passiflora suberosa* L. **Bioscience Journal**, v.31, p.445-450, 2015.

NÓBREGA, D. S.; PEIXOTO, J. R.; VILELA, M. S.; FALEIRO, F. G.; GOMES, K. P. S.; SOUSA, R. M. D.; NOGUEIRA, I. Agronomic descriptors and ornamental potential of passion fruit species. **Ornamental Horticulture**, v.23, p.357-362, 2017.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.1, p. 33-46, 2001.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 6, p.143-158, 2005.

OLIVEIRA JÚNIOR, M. X.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; MORAIS, O. M.; DOURADO, F. W. N. Superação de dormência de maracujá-do-mato. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, p. 584-590, jun., 2010.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulture**, v.144, p.42-47, 2012.

PADOAN, D.; MOSSAD, A.; CHIANCONE, B.; GERMANA, M. A.; KHAN, P. S. S. V. Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, p.283-290. 2013.

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.381-390, 2014.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, p.193-217, 1995.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 458-462, 2005.

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A-A. F.; FIGUEIREDO, A. L.; GOMES, F. P.; SOUZA, M. M. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum**, v.34, p.67-75, 2012.

PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; UMAPATHY, K.; SORNAKILI, A.; THIRUVENGADAN, R. Induced resistance in tomato plants to *Helicoverpa armigera* by mixed formulation of *Bacillus subtilis* and *Beauveria bassiana*. **Research Journal Of Biotechnology**, v.12, p.53-59, 2017.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; TOLEDO PICOLI, E.A.; COSTA, M.G.C.; REGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.39, p.618–622, 2003.

RYAN, C. A. The system in signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1477, p.112-121, 2000.

RYBKA, A. C.; CASTRO, C.; LIMA, A.; FERREIRA, M. A.; PEREIRA, R. Elaboração de geleia de Maracujá-da-caatinga (*Passiflora cincinnata*) BRS Sertão forte. In: II Congresso Internacional de Gastronomia e Ciência de Alimentos. Fortaleza - CE, 2016. – **Anais**, Gastronomia: da tradição à inovação, Fortaleza: UFC, 2016.

ROCHA, D.I.; PINTO, D.L.P.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W.C.; Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v.252, p.249- 257, 2015.

ROCHA, D.I; MONTE-BELLO C.C; DORNELAS, M.C; AIZZA, L.C.B. A passion fruit putative ortholog of the somatic embryogenesis Receptor Kinase1 gene is expressed throughout the in vitro de novo shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.125, p.1-11, 2016.

ROSA, Y.B.C.J.; DORNELAS, M.C. In vitro plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, p.91-99, 2012.

SANCHÊS, R. C. V. S. **Análises citogenéticas em acessos de *Cucumis melo* L. e híbridos triplos de *Passiflora* L.** Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2018. (Tese - Doutorado em Genética e Biologia Molecular).

SANKARI, J. U.; DINAKAR, S.; SEKA, C. Dual effect of *Azospirillum* exopolysaccharides (eps) on the enhancement of plant growth and biocontrol of blast (*Pyricularia oryzae*) disease in upland rice (var. ASD-19). **Journal of Phytology**, v.3, p.16-19, 2011.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; ALMEIDA, A. A. F.; FREITAS, J. C. O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v.184, p.389–399, 2012.

SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.13, p.209-214, 2015.

SILVA, M. L.; PAIM-PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. 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**, v.99, p.47–54, 2009.

SILVA, C. V.; OLIVEIRA, L. S.; LORIATO, V. A. P.; SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI L. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.407-416, 2011.

SILVA, M. L.; PAIM PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; LANI, E. R. G.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. A. B.; OTONI, W. C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**, v.21, p.331-338, 2015.

SILVA, M. S., SILVA, R. P.; SOUZA, A. V. L.; XAVIER, Y. P. M.; OLIVEIRA, A. C.; COQUEIRO, D. S. O. Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-7, 2016.

SILVA, C. M.; PINHEIRO, C. C. C.; SOUSA, I. A. L.; LINS, P. M. P.; SILVA, G. B.; CARVALHO, E. A. Controle biológico de *Bursaphelenchus cocophilus* por rizobactérias e *Trichoderma* spp. **Nativa**, v.6, p.233-240, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III, 3 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 768, 2012.

SOUZA, A. C. **Caracterização morfológica, estimativa de parâmetros genéticos e análises de comportamento meiótico em híbridos interespecíficos f1 de *Passiflora* L.** Universidade Estadual de Santa Cruz, 2017. (Dissertação - Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

SOUZA, V. O. de. **Análises morfológicas, genéticas e citogenéticas em híbridos interespecíficos de *Passiflora coccinea* e *P. hatschbachii*.** Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2018. (Tese - Doutorado em Produção Vegetal).

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesisrelated proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.23-29, 2011.

THOMAS, T. D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, p.1–14, 2008.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press. 224p. 2000.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p. 85-97, 1999.

VIANA, A. J. C.; SOUZA M. M.; ARAÚJO I. S.; CORREA R. X.; AHNERT D. Genetic diversity determined by morphological and molecular characterization in wild *Passiflora* L. species with ornamental potential. **Biologia Plantarum**, v.54, p.535–538. 2010.

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; DA SILVA, L. C.; DE CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. 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**, v.50, p.738-745, 2014.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**, v.108, v.1-33, 2014.

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**, v.52, p.41–54, 2016.

CAPITULO I

O endosperma na produção de plantas triploides ornamentais e frutíferas – revisão geral

1. INTRODUÇÃO

Poliploides são organismos que, durante o curso evolutivo, sofreram duplicação de genomas, apresentando mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo (Madlung, 2013; Wendel et al., 2016). Embora a duplicação cromossômica não introduza um novo material genético e produza apenas cópias adicionais de genes e cromossomos existentes, muitas alterações genômicas ocorrem após a poliploidização (Barker et al., 2016; Van de Peer et al., 2017), viabilizando a formação de fenótipos modificados ou aumentando as variações fenotípicas (Spoelhof et al., 2017).

Acredita-se que a poliploidização seja uma das principais forças da evolução e de aprimoramento das culturas de plantas agrícolas (Van de Peer et al., 2017). Alterações citogenéticas nos indivíduos triploides podem modificar a inter-relação entre as plantas e o ambiente, tornando-as mais vantajosas que seus parentais diploides (Madlung, 2013). Os triploides geralmente apresentam crescimento vegetativo vigoroso, ganhos em biomassa e estatura, maior tolerância a ataques de pragas e doenças e a estresses causados por temperatura, déficit hídrico, salinidade, déficit nutricional e a herbicida (Comai, 2005; Deng et al., 2012; Allario et al., 2013; Chao et al., 2013; Elmaghrabi et al., 2013; del Pozo e Ramirez-Parra, 2014; Barker et al., 2016; Liao et al., 2016; Wang et al., 2016; Nakel et al., 2017).

O cultivo in vitro de endosperma surge como uma estratégia promissora e direta na produção de plantas triploides. A regeneração de plantas triploides a partir do endosperma foi reportada com sucesso para várias espécies de plantas, como por exemplo nas frutíferas *Passiflora edulis* (Antoniazzi et al., 2018), *Actinidia* spp. (Kin et al., 1990; Góralski et al., 2005; Asakura; Hoshino, 2017), *Citrus* spp. (Gmitter et al., 1990), *Carica papaya* (Sun et al., 2011), *Gomortega keule* (Muñoz-Concha, 2016) e nas ornamentais *Acacia nilotica* (Garg et al., 1996), *Passiflora foetida* e *Passiflora cristalina* (Mohamed et al., 1996; Faria et al., 2018), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003), *Anthurium andreanum* (Winarto et al., 2018) e *Melia azedazach* (Thang et

al., 2018), onde as plantas regeneradas mantiveram o mesmo nível de ploidia do endosperma, demonstrando que plantas triploides podem ser produzidas a partir de plantas diploides.

Em plantas triploides ornamentais, busca-se a produção de novas cultivares ou variações de plantas com atributos florais melhorados, cores das flores variadas, maior tempo de floração, fragrância e vida útil na pós-colheita (Vichiato et al., 2014; Liao et al., 2016; Basumatari; Das, 2017; Liqin et al., 2019). Em frutíferas triploides, um dos principais objetivos é a ausência de sementes nos frutos, que além de ser apreciado por consumidores e pelas indústrias, melhoram a qualidade fisiológica das frutas, aumentando o tempo de prateleira (Chen et al., 2014; Navarro et al., 2015; Sumarji; Suparno et al., 2017).

O grau de triploidia é benéfico do ponto de vista comercial e agrônômico, pois as plantas triploides comumente mantêm a produtividade mesmo em condições adversas, como em solos de baixa fertilidade, com déficit hídrico, temperaturas variadas e sobre ataques de patógenos (Comai, 2005; Liao et al., 2016; Whang et al., 2016). A cultura in vitro de tecidos endospermicos, apesar de desafiadora, pode ser amplamente utilizada para a produção de plantas uniformes, isentas de patógenos e de alta qualidade em escala comercial, sendo um excelente mecanismo no suprimento da demanda por plantas triploides.

2. Cultivo in vitro de endosperma em plantas ornamentais e frutíferas

De natureza triploide, o endosperma é um tecido único em origem, desenvolvimento e nível de ploidia e expressa a maior parte dos genes em uma proporção materna-paterno 2:1 (Whang et al., 2016; Satyaki; Gehring, 2017). Logo, as plantas originadas a partir do endosperma se tornam triploides e podem apresentar fertilidade reduzida ou esterilidade completa (Thomas; Chaturvedi, 2008; Hoshiro et al., 2011).

O uso do tecido endospermico consiste em um sistema direto para reprodução de plantas triploides (Thomas; Chaturvedi, 2008; Kosmiatin; Husni, 2018; Antoniazi et al., 2018; Mikovski et al., 2019). O método convencional para produção de triploides é demorado e dispendioso devido o sistema reprodutivo único e longo ciclo de vida das

plantas, que dificultam a obtenção dos resultados esperados através da reprodução por cruzamentos sexuais (Hoshino et al., 2011). Em decorrência disso, a cultura do endosperma surge como método promissor para reduzir o tempo de produção de plantas triploides. Resultado expressivo foi relatado por Muñoz-Concha (2016), trabalhando com a espécie arbórea frutífera *Gomortega keule*. Naturalmente, a porcentagem de germinação das sementes de *G. keule* é inferior a 40% e o tempo de germinação excede os 12 meses. Através do cultivo in vitro do endosperma, foi possível regenerar plântulas triploides desta espécie em apenas 18 meses. Thang et al. (2018) obtiveram plantas triploides de *Melia azedazach* em apenas 5 meses a partir da regeneração de endosperma imaturo, enquanto que se leva em média 12 anos para geração de triploides pelo método tradicional.

O estabelecimento de protocolos responsivos para o desenvolvimento completo de plantas triploides no cultivo in vitro de endosperma é dependente de vários fatores, como o balanço entre os reguladores de crescimento e a interação com a fonte de explante, temperatura, luz, pH, nutrientes e estágio das sementes (Monteiro et al., 2000).

Segundo Thomas e Chaturvedi (2008), na cultura de endosperma deve-se levar em consideração o estágio de desenvolvimento do tecido do endosperma, que geralmente é calculado como Dias Após a Polinização (DAP) que varia de planta para planta. Por conseguinte, o endosperma pode ser usado em estágio imaturo ou maduro, sendo um fator determinante para a regeneração dos indivíduos. Em laranjas doces (*Citrus sinensis*) e tangerina (*Citrus reticulata*), culturas de endosperma isoladas de frutos com 12 semanas após a antese induziram com sucesso a formação de calos, mas não houve regeneração de gemas (Usman et al., 2008).

Thammina et al. (2011), utilizaram endosperma maduro e imaturo de *Euonymus alatus* e obtiveram 14% e 50% de formação de calos, respectivamente. As taxas de regeneração de plantas triploides observadas foram de 0,42% nos explantes de endosperma imaturo e 0,34% nos explantes de endosperma maduro. Recentemente, para a espécie *Passiflora edulis*, foi observado um sistema eficiente de regeneração por organogênese através do endosperma maduro, com maior número de brotações e regenerações em meio MS suplementado com TDZ 9,0 μ M, obtendo média de 59,2 brotos por explante e 4,2 plantas triploides regeneradas por explante. Faria e

colaboradores (2018) também relataram alta capacidade de resposta do endosperma maduro de *Passiflora cristalina* em meio suplementado com 8,87 μ M BA. Segundo os autores foi possível obter número médio de 193 brotos por explante.

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados neste sistema de cultivo, pois a interação entre esses hormônios é responsável pela divisão, diferenciação e crescimento das células vegetais (García-González et al., 2010). Explantes endospermicos inoculados em meios de cultivos livres de hormônios tendem a não produzir calos e ficam senescentes sem nenhum sinal de crescimento (Sun et al., 2011).

Dentre as auxinas, o ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D) é o mais conhecido, e induz efetivamente a formação de calos no endosperma, devido aos estímulos na divisão celular dos tecidos vegetais (Osman et al., 2016). No grupo das citocininas, a benziladenina (BA) é a de maior destaque. Essa citocinina caracteriza-se pela capacidade de aumentar a divisão celular e de desempenhar relevante competência na indução e no desenvolvimento de brotações, da parte aérea e de raízes (Moubayidin et al., 2009; Wang et al., 2016).

Endospermas de diversas plantas apresentam extraordinária plasticidade para responder a estímulos externos. O caráter do endosperma de expressar a totipotencialidade é manifestado pela sua capacidade de regenerar plantas (Thomas; Chaturvedi, 2008; Hoshino et al., 2011). A regeneração pode ser realizada através da organogênese e embriogênese somática. A organogênese conduz à diferenciação de meristemas caulinares e/ou radiculares, formando brotações e raízes, e tem sido até agora a principal via de regeneração aplicada no cultivo in vitro do endosperma (Hoshino et al. 2011; Wang et al., 2016; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018; Mikovski et al., 2019).

A indução in vitro de endosperma de espécie ornamental foi primeiramente obtida por Srivastava (1971), com cultivo do endosperma maduro de *Jatropha panduraefolia* (Tabela 1). Em 1977, Bapat e Narayanaswamy obtiveram com sucesso brotos do endosperma maduro da espécie frutífera *Achras sapota* através da organogênese (Tabela 2).

Tabela1. Cultivo in vitro de endosperma e vias de regeneração em plantas ornamentais

Espécie	Estágio do Endosperma	Sistema de Regeneração	Referência
<i>Jatropha panduraefolia</i>	Maduro	Organogênese	Srivastava, 1971
<i>Putranjiva roxburghii</i>	Maduro	Organogênese	Srivastava, 1973
<i>Codiaeum variegatum</i>	Maduro	Organogênese	Chikkannaiah e Gayatri, 1974
<i>Nigella damascena</i>	Maduro	Organogênese	Sethi e Rangaswamy, 1977
<i>Acacia nilótica</i>	Imaturo	Embriogênese Somática	Garg et al., 1996
<i>Passiflora foetida</i>	Maduro	Organogênese	Mohamed et al., 1996
<i>Azadirachta indica</i>	Imaturo	Organogênese	Chaturvedi et al., 2003
<i>Passiflora</i> spp.	Maduro	Organogênese	Guzzo et al., 2004
<i>Lonicera caerulea</i>	Imaturo	Organogênese	Miyashita et al., 2009
<i>Santalum album</i> L.	Imaturo	Embriogênese Somática	Sukanto, 2011
<i>Euonymus alatus</i>	Imaturo/Maduro	Organogênese	Thammina et al., 2011
<i>Mallotus philippinensis</i>	Imaturo	Organogênese	Sharma et al., 2012
<i>Sapium sebiferum</i>	Maduro	Organogênese	Tian et al., 2012
<i>Phlox drummondii</i>	Imaturo	Organogênese	Tiku et al., 2014
<i>Gomortega keule</i>	Maduro	Embriogênese Somática	Munöz-Concha, 2016
<i>Anthurium andreanum</i>	Maduro	Organogênese	Winarto et al., 2018
<i>Melia azedarach</i>	Imaturo	Organogênese	Thang et al., 2018
<i>Passiflora cristalina</i>	Maduro	Organogênese	Faria et al., 2018

Tabela 2. Cultivo in vitro de endosperma e vias de regeneração em plantas frutíferas

Espécie	Estágio do Endosperma	Sistema de Regeneração	Referência
<i>Achras sapota</i>	Maduro	Organogênese	Bapat e Narayanaswamy, 1977
<i>Pyrus malus</i>	Imaturo	Organogênese	Shihkin e Shuchiung, 1977
<i>Citrus grandis</i>	Imaturo	Organogênese	Wang e Chang, 1978
<i>Malus pumila</i>	Imaturo	Organogênese	Mu e Liu, 1978
<i>Prunus pérsica</i>	Imaturo	Organogênese	Liu e Liu, 1980
<i>Actinidia chinensis</i>	Maduro	Organogênese	Gui et al., 1982
<i>Cocos nucifera</i>	Imaturo	Organogênese	Kumar et al., 1985
<i>Emblica officinalis</i>	Maduro	Organogênese	Sehgal e Khurana, 1985
<i>Annona squamosa</i>	Maduro	Organogênese	Nair et al., 1986
<i>Juglans regia</i>	Imaturo	Embriogênese somática	Tulecke et al, 1988
<i>Pyrus communis</i>	Imaturo	Organogênese	Zhao, 1988
<i>Actinidia</i> spp.	Imaturo Maduro	Organogênese	Kin et al., 1990
<i>Citrus</i> spp.	Maduro	Organogênese	Gmitter et al., 1990
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Maduro	Organogênese	Kagan-Zur et al., 1990
<i>Cocos nicifera</i>	Imaturo	Organogênese	Ceniza et al., 1992
<i>Diospyros kaki</i>	Imaturo	Organogênese	Tao et al., 1997
<i>Morus alba</i>	Imaturo	Organogênese	Thomas et al., 2000
<i>Actinidia deliciosa</i> cv. Hayward	Maduro	Organogênese	Góralski et al., 2005
<i>Citrus reticulata</i> L. <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Imaturo Maduro	Embriogênese Somática	Usman et al., 2008
<i>Citrus</i> spp.	Maduro	Organogênese	Sunyoto et al., 2010
<i>Carica papaya</i>	Imaturo	Organogênese	Sun et al., 2011
<i>Citrus nobilis</i> Lour. cv Simadu	Maduro	Embriogênese Somática	Kosmiatin et al., 2014
<i>Mangifera indica</i> L	Maduro	Embriogênese Somática	Hindaningrum et al., 2014
<i>Persea americana</i>	Maduro	Embriogênese Somática	Sukmara et al., 2014

<i>Actinidia deliciosa</i> var. <i>deliciosa</i>	Maduro	Organogênese	Popielarska-Konieczna e Kleszcz, 2015
<i>Actinidia kolomikta</i>	Imaturo	Organogênese	Asakura e Hoshino, 2017
<i>Passiflora edulis</i>	Maduro	Organogênese	Antoniazzi et al., 2018
<i>Citrus</i> RGL	Maduro	Organogênese	Sari et al., 2019

A via de regeneração pela embriogênese somática conduzidos até o momento, se concentram principalmente em espécies frutíferas arbóreas de interesse comercial, como o *Citrus nobilis* Lour. cv Simadu (Kosmiatin et al., 2014), *Mangifera indica* L (Hindaningrum et al., 2014) e *Persea americana* (Sukmara et al., 2014) (Tabela 2). O sistema de regeneração pela via embriogênica, apesar do seu estabelecimento escasso, é vantajosa devido à redução de custos por unidade produzida e o tempo para a produção de grande número de plantas completas e com maior uniformidade (Kosmiatin; Husni, 2018). No caso das espécies frutíferas e ou ornamentais arbóreas, o genótipo triploide apresentando maior vigor fisiológico é interessante como uma nova variedade ou porta-enxerto, tendo em vista a demorada taxa de crescimento em campo dessas espécies (Muñoz-Concha, 2016).

Tulecke et al. (1988) iniciou a indução a embriogênese em espécie frutífera ao analisar a capacidade embriogênica dos endospermas imaturos de *Juglans regia* cultivados no escuro em meio sólido DKW, contendo 0,01 mgL⁻¹ de IBA, 2 mgL⁻¹ de Kin, 1 mgL⁻¹ de Kin, 1 mgL⁻¹ de BA e 250 mgL⁻¹ de glutamina. As plantas regeneradas por embriogênese somática do tecido do endosperma permaneceram morfológicamente uniformes e teve número cromossômico triploide de 3n = 48.

Recentemente, nosso grupo de trabalho elaborou um sistema completo e reproduzível de regeneração pelas vias organogênica e de embriogênese somática a partir de endospermas maduros de *P. cinnamomata* (Dados não publicados). Os endospermas maduros isolados foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1960) suplementado com o regulador BA na concentração de 8,87 µM para indução de organogênese. Aos 15 dias de cultivo primórdios de brotações já estavam evidentes, demonstrando alta responsividade, com plantas triploides completas obtidas aos 120 dias de cultivo. Para regeneração pela via embriogênica, endospermas maduros foram cultivados em meio MS suplementado com 18,1 µM 2,4-D e 4,5 µM BA (Silva et al., 2009), cultivados na ausência de irradiância. Aos 15 dias de cultivo in vitro massa

celular pro-embriogênica já foram observadas nos explantes endospermicos e aos 30-45 dias embriões somáticos foram formados e com 90 dias plantas completas foram obtidas (Figura 1).

As respostas morfogênicas obtidas no cultivo in vitro do endosperma de *P. cincinnata* demonstra o potencial desse tecido em expressar a pluri e totipotencialidade celular ao responder os sinais dos reguladores de crescimento. As plantas foram caracterizadas por descritores morfoagronômicos e tiveram a triploidia confirmada ($3X=3N=18$) por meio da citometria de fluxo.



Figura 1. Flores da espécie *P. cincinnata*. **(A)** Flor diploide obtidas através da germinação de sementes. Bar. 13mm; **(B)** Flor triploide de planta regenerada in vitro a partir do tecido do endospermico pela via embriogênica. Bar. 13mm.

3. Plantas triploides

A triploidia é o termo que se refere a presença de três conjuntos de cromossomos em um organismo ou linhagem celular denominado $3x=3n$. Os triploides podem ser gerados ocasionalmente em populações naturais de plantas com floração através da hibridação sexual entre plantas diploide ($2n$) e tetraploide ($4n$), da união somática e da hibridação sexual entre gametas reduzidos e não reduzidos de progenitores diploides ou, por meios sintéticos, através da hibridação artificial, fusão de protoplasto e da regeneração do endosperma (Wang et al., 2016; Nakel et al., 2017; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018).

Plantas triploides são raramente encontradas na natureza devido a fertilidade reduzida ou esterilidade completa, o que dificulta a reprodução sexual dessas plantas (Wang et al., 2016). Contudo, a esterilidade muitas vezes não se torna prejudicial por completo e, algumas plantas triploides espontâneas podem reprimir essa barreira através da propagação vegetativa (Whang et al., 2016; Rouiss et al., 2018).

As causas mais comuns para o surgimento espontâneo de triploides na natureza é ocasionado por condições ambientais desfavoráveis, como temperaturas baixas, forte exposição à radiação UV-B, a escassez de água e a baixa nutrição que levam a erros nas divisões meióticas e na produção de gametas femininos sem redução do número de cromossomos ($2n$) (Mason et al., 2011; Sora et al., 2016; Novikova et al., 2018). Em decorrência dessas falhas, as variações no nível de ploidia modifica diretamente a quantidade de cromatina no núcleo e o número de cópias de cada gene (Simon-Porcar et al., 2017). Assim, a triploidia causa consequências imediatas na expressão gênica, no tamanho nuclear, celular e dos órgãos (Serapiglia et al., 2015; Sattler et al., 2016; Simon-Porcar et al., 2017; Liqin et al., 2019).

3. Alterações morfofisiológicas em plantas triploides

3.1 Fertilidade reduzida

O mais importante efeito fenotípico da triploidia é sobre a fertilidade, em que indivíduos de ploidia ímpar, em geral triploide e pentaploide, apresentam esterilidade total ou parcial, devido ao desbalanceamento no número de cromossomos durante a meiose, podendo causar redução da fertilidade, esterilidade das sementes e abortamento dos frutos (Aleza et al., 2010; Grosser et al., 2014; Wang et al., 2016).

A produção de triploides têm grande importância no desenvolvimento de cultivares sem sementes que são desejáveis para o mercado de frutas (Xie et al., 2019). As sementes em muitas frutas são indesejáveis por conta da dureza, e devido a produção de hormônios que promovem a deterioração mais rápida das frutas (Chen et al., 2014; Navarro et al., 2015; Sumarji; Suparno et al., 2017). As frutas sem sementes comumente têm melhor qualidade e vida útil mais longa (Pandolfini, 2009). Segundo Aleza et al. (2010), a produção de frutas cítricas sem sementes é uma das características mais

importantes a serem trabalhadas no melhoramento genético de citrus, pois consumidores não aceitam a presença de sementes nos frutos.

Diante disso, trabalhos promissores foram realizados por Navarro et al. (2015) e Xie et al. (2019), que, através de hibridações sexuais, obtiveram híbridos triploides de tangerinas com frutos sem sementes e de alta qualidade. Em melancia, Sumarji e Suparno et al. (2017) obtiveram frutas sem sementes, com melhor qualidade do fruto e menor quantidade de água, produzidas através do cruzamento de plantas tetraploides com plantas diploides.

Em espécies ornamentais, o desenvolvimento do fruto reduz o período de floração e diminui o valor ornamental de muitas plantas (Vichiato et al., 2014; Wang et al., 2016). O período de floração é considerado um fator determinante para o sucesso de plantas comerciais (Jung; Müller, 2009). Recentemente, Li e Ruter (2017) obtiveram avanços valiosos para o melhoramento de atributos florais na cultura do hibisco (*Hibiscus moscheutos*) ao produzir plantas triploides estéreis que floresceram por mais tempo que os seus respectivos diploides.

Uma planta é considerada estéril ou infértil se for capaz de produzir frutos completamente desprovidos de sementes, que contenham um número reduzido e/ou frutos que apresentam sementes abortadas (Pondolfini, 2009). Muitas plantas têm a semente como uma estrutura necessária para a perpetuação de suas espécies (Cardoso et al., 2015). Nestes casos, quando as sementes são usadas comercialmente, a esterilidade é indesejável, sendo possível compensar a ausência das sementes, em algumas situações, com a reprodução vegetativa (Thomas e Chaturvedi, 2008).

Por outro lado, a esterilidade torna-se desejável para reduzir a propagação não desejada de espécies ornamentais não nativas em áreas naturais (Phillips et al., 2016). No geral, as espécies de plantas ornamentais são populares devido a uma combinação de caracteres atrativos, sendo amplamente produzidas e vendidas em diferentes países (Azadi et al., 2016). Mas, algumas delas, apresentam ampla adaptação e a propagação ocorre facilmente, tornando-se um sério problema ecológico ao invadir novas áreas (Rounsaville et al. 2011; Czarnecki et al., 2014; Phillips et al., 2016).

O desenvolvimento de cultivares ornamentais através da produção de plantas triploides de baixo potencial reprodutivo, seria uma alternativa desejável para a

aplicação em paisagismo, frente as cultivares férteis atualmente disponíveis (Rounsaville et al., 2011; Wang et al., 2016). Esta valiosa alternativa foi desenvolvida com sucesso nas plantas de *Lantana camara*, que é uma espécie popular de paisagismo e viveiro e a *Pyrus calleryana*, espécie de pera usada no paisagismo e ornamentação. O estabelecimento de cultivares triploides possibilitou a produção de plantas estéreis com potencial redução da capacidade de polinização, diminuindo a invasividade dessas espécies ornamentais (Czarnecki et al., 2014; Phillips et al., 2016).

3.2 Alterações morfológicas

Os triploides são visivelmente diferentes ou, às vezes, superiores aos diploides em termos de expressões morfológicas. Este fenômeno é conhecido como efeito “gigas”, que ocorre devido à adição de cópias genéticas extras (Alam et al., 2015; Sattler et al., 2016; Simon-Porcar et al., 2017). Assim, plantas triploides podem apresentar maior vigor, hábito mais curto, aumento da dureza do tronco, ganhos em biomassa, maior crescimento e densidade radicular; alterações no formato e tamanho das flores, folhas mais espessas e largas e frutos mais robustos (Thomas; Chaturvedi, 2008; Padoan et al., 2013; Mondal, 2014; Serapiglia et al., 2015; Wang et al., 2016; Liqin et al., 2019).

As modificações fenotípicas e genéticas em plantas triploides podem ocorrer devido a produção de células somáticas maiores (Sattler et al., 2016; Manzoor et al., 2019), que aumenta o conteúdo nuclear e causa redução na divisão celular durante seu crescimento e desenvolvimento (Simon-Porcar et al., 2017). Outro motivo é a economia de energia fotossintética, pois a energia normalmente usada na formação e desenvolvimento das sementes é revertida para o crescimento vegetativo (Miyashita et al., 2009; Hoshino et al., 2011; Tikunov et al., 2014).

Importantes efeitos morfológicos foram obtidos em espécies triploides do gênero *Populus*, em estudos realizados por Liao et al. (2016) e Liqin et al. (2019). Foram comparadas plantas diploides, triploides e tetraploides de *Populus* e observaram que os triploides apresentaram as melhores alterações nas características de interesses agrônômicos, como maior crescimento vegetativo e vigor, altura média, área foliar, ganho em biomassa e comprimento médio do pecíolo.

Além de melhorar as características ornamentais, como flores e folhas, a triploidia também pode aumentar o rendimento de plantas frutíferas de interesse comercial. Rimmer et al. (2007) e seus colaboradores investigaram as características morfológicas e de frutificação de mamão triploide derivado da anthera. Todos os frutos obtidos das plantas triploides apresentaram alto rendimento, sendo relativamente mais pesados que o mamão diploide comercial e seus frutos não apresentavam sementes. Nos abacaxizeiros triploides espontâneos ‘Gigante de Tarauacá’ e o *Ananas comosus* var. *ananassoides*, resultados demonstram que os frutos dos triploides são maiores que dos seus respectivos genótipos diploides (Matos; Reinhardt, 2009; Coppens D’eeckenbugge et al., 2013). Por meio de hibridações sexuais, Navarro et al. (2015) e Najat et al. (2017), desenvolveram novas cultivares triploides de tangerina sem sementes, com grande potencial comercial. Os híbridos de tangerina apresentaram frutos de alta qualidade e tamanho, fácil de descascar, mais suculentos e doces, com maior peso médio e ausência de sementes, comparados ao controle diploide.

As alterações morfológicas em plantas triploides são abordagens que podem ser utilizadas para confirmar o nível de ploidia em plantas derivadas de tecidos endospermicos (Thomas; Chaturvedi, 2008). A determinação ou identificação do nível de ploidia é importante para demonstrar a eficiência do método de produção (Zhang et al., 2019). Diferentes características morfológicas podem ser estudadas, como o tamanho de caule, folhas, flores e pólen (Padoan et al., 2013; Tiku et al., 2014; Popielarska-Konieczna; Kleszcz, 2015).

As caracterizações morfológicas são métodos indiretos, práticos e fáceis de se mensurar. As determinações de ploidia que se baseiam na morfologia das plantas são realizadas por meio de descritores (Zhang et al., 2019). É considerado o método mais simples de se identificar poliploides, mas nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia somente a partir da morfologia, principalmente em razão da expressão de fatores ambientais no fenótipo, podendo alterar o crescimento das plantas em condições adversas (Usman et al., 2008; Manzoor et al., 2019). Mesmo assim, a precisão desta determinação é bastante alta, podendo chegar a 80% (Ye et al., 2010) e possibilita estudar a diversidade genética dentro das espécies, individualizando fenotipicamente cada planta (Kosmiatin et al., 2016; Poerba et al., 2017).

3.3 Desenvolvimento estomático: fator responsável pela maior resistência ao estresse hídrico

As alterações da função estomática em triploides é imprevisível devido a estrutura genômica única. A triploidia é importante nas plantas porque os genomas extras podem levar a expressão gênica de características funcionais, estruturais e fenotípicas, que conduzem às interações planta-ambiente (Barker et al., 2016; Spoelhof et al., 2017; Van de Peer et al., 2017).

Geralmente, as folhas de plantas triploides apresentam maior taxa fotossintética por conta do aumento do número de cloroplastos (Padoan et al., 2013), maiores concentrações de clorofilas e carotenoides (Lu et al., 2015; Liao et al., 2016) e maior extensão dos estômatos, comprimento, largura e diâmetro das células guardas e menor densidade estomática (Padoan et al., 2013; Greer et al., 2018; Liqin et al., 2019).

O tamanho e a densidade dos estômatos têm influência direta nas taxas de trocas gasosas das plantas, pois afetam a fotossíntese, absorção de CO₂, regulação do uso da água e a produção de biomassa (Tanaka et al., 2014). Em álamo tremedor (*Populus tremula*), verificou-se que as plantas triploides cresceram mais rápidos que as diploides devido aos maiores resultados nos rendimentos quânticos da fixação de CO₂ e nas taxas de fotossíntese líquida (Pärnik et al., 2014). Padoan et al. (2013) observaram que as plantas triploides de *Citrus clementina* possuíam folhas menores e mais estreitas que as diploides, contudo, apresentaram maior índice foliar. O índice foliar revela a plasticidade em resposta as condições ambientais ou fisiológicas, como a variação natural e adaptação ambiental (Tsukaya, 2002). Além disso, maximiza a eficiência do uso da água entre os ambientes, permitindo uma resposta rápida ao estresse hídrico, causando menor percentual de perda de água das folhas (Padoan et al., 2013).

Reguladores de crescimento de plantas, como as auxinas e o ácido abscísico (ABA) desempenham papéis essenciais no padrão estomático específico de plantas triploides. Liqin et al. (2019) encontraram superexpressão gênica de auxinas e do ABA em álamos triploides, em relação aos diploides e tetraploides. As variações das expressões genéticas ocasionados pela triploidia, resultou em aumento dos níveis endógenos de auxina, que inibe o desenvolvimento dos estômatos (Zhang et al. 2014) e

do ABA, que está envolvido na adaptação de plantas ao estresse hídrico, pois induz o fechamento estomático e limita o início do seu desenvolvimento (Tanaka et al. 2013).

Quando nenhuma característica morfológica é conhecida para distinguir os diferentes citótipos, o comprimento, frequência dos estômatos e número de cloroplastos surgem como indicadores de ploidia (Usman et al., 2008; Sun et al., 2011; Popielarska-Konieczna; Kleszcz, 2015; Kosmiatin et al., 2016; Antoniazzi et al., 2018; Winarto et al., 2018; Kosmiatin et al., 2019).

Em várias espécies triploides, existe uma relação direta entre o nível de ploidia e suas características fisiológicas, apresentando geralmente maior comprimento e menor frequência dos estômatos em decorrência do aumento de ploidia (Padoan et al., 2013; Greer et al., 2018; Liqin et al., 2019).

3.4 Alterações químicas: aumento da tolerância e resistência a fatores bióticos e abióticos em plantas triploides

Eventos de alterações de níveis de ploidia tem sido recorrentemente associado as alterações químicas, o que amplia a tolerância ambiental e fornece flexibilidade ecológica e evolutiva a planta (Spoelhof et al., 2017; Van de Peer et al., 2017; Corneillie et al., 2019). Tais modificações podem conferir ao triploide aumento da tolerância ao estresse salino, déficit hídrico, temperaturas, patógenos (Allario et al., 2013; Chao et al., 2013; Elmaghrabi et al., 2013; del Pozo; Ramirez-Parra, 2014; Liqin et al., 2019), maior resistência ao estresse hídrico, frio, déficit nutricional e a herbicida (Deng et al., 2012; Liao et al., 2016; Nakel et al., 2017).

A maior capacidade fisiológica está relacionada a produção de compostos metabólitos e da regulação metabólica, de enzimas e aumento da atividade enzimática, das mudanças estruturais da parede celular e do conteúdo fitoquímico, garantindo a planta triploide melhor desempenho sob condições extremas de cultivo (Serapiglia et al., 2015; Liqin et al., 2019).

Recentemente, Liqin et al. (2019) observaram maiores alterações no conteúdo e na expressão dos compostos químicos de lignina e peroxidase em plantas triploides de *Populus*, em relação aos seus parentais diploides e tetraploides. A lignina é um polímero natural, de natureza hidrofóbica e fortalecedora, que permite que os vasos do xilema

transportem água e nutrientes para reforçar as paredes celulares da planta, permitindo que as plantas cresçam e permaneçam firmes e desenvolvam barreiras mecânicas contra os patógenos (Guragain et al., 2015; Liqin et al., 2019).

As enzimas peroxidases estão envolvidas nos processos fisiológicos essenciais das plantas (Pandey et al., 2017). Estas enzimas desempenham importante papel na tolerância a seca, ao estresse oxidativo e ambiental, cicatrização de feridas, defesa contra patógenos, lignificação, embriogênese somática e metabolismo da auxina (Pandey et al., 2017; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2019).

4. Perspectivas no melhoramento genético de plantas triploides

A cultura do endosperma in vitro é uma técnica única e direta para produzir plantas triploides a partir de plantas diploides. Ainda que haja variações de ploidia em algumas plantas derivadas de endospermas, achados demonstraram que os endospermas de muitas espécies têm habilidades de regeneração de plantas 100% triploides. A crescente demanda de materiais vegetais para produção de frutas, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, bioenergia, ornamentação e paisagismo coloca o cultivo in vitro do endosperma como um importante método para produção rápida e eficaz para a produção plantas poliploides com características interessantes para o melhoramento genético. Plantas triploides comumente apresentam superioridade no crescimento vegetativo, maior rendimento biológico e maior resistência a estresses abióticos e bióticos em comparação com os diploides.

Apesar dos trabalhos de indução in vitro do endosperma se concentrar na organogênese, demonstramos que a embriogênese somática através do cultivo in vitro de endosperma é um sistema direto de regeneração de plantas. O estabelecimento da embriogênese somática da espécie *P. cincinnata* abrem novas perspectivas para a produção de plantas triploides estáveis por meio dessa via de regeneração reproduzível com o uso o endosperma, tornando-se uma ferramenta eficiente para a propagação vegetativa de plantas superiores.

Embora um protocolo de embriogênese somática para a cultura de endosperma tenha sido estabelecido com sucesso, muitas perguntas permanecem sem resposta. Sugerimos novos estudos que se concentrem, principalmente, na compreensão de quais

mecanismos estão envolvidos na formação das plantas triploides, os efeitos nos processos metabólicos, como os bioquímicos e enzimáticos e análises da expressão gênica relacionados as mudanças das características morfológicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, H.; RAZAQ, M.; SALAHUDDIN. Induced Polyploidy as a Tool for Increasing Tea (*Camellia sinensis* L.) Production. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.22, p.43-47, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(16\)30005-8](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(16)30005-8)

ALEZA, P.; JUAREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Reports**, v.29, p.1023-1034, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0888-7>

ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; IGLESIAS, D. J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. **Plant, Cell & Environment**. v.36, p.856-868, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12021>

ANTONIAZZI, C. A.; FARIA, R. B.; CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; MATOS, E. M.; OTONI, W. C. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. v.238, p.408-415, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.001>

ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. **Scientia Horticulturae**. v.219, p.53-59, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.045>

AZADI, P.; BAGHERI, H.; NALOUSHI, A. M.; NAZARI, F.; CHANDLER, S. F. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. **Biotechnology Advances**, v.34, p.1073-1090, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.006>

BAPAT, V. A.; NARAYANASWAMY, S. Mesocarp and endosperm culture of *Achras sapota* Linn. in vitro. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.15, p.294-296, 1977.

BARKER, M. S.; ARRIGO, N.; BANIAGA, A. E.; LI, Z.; LEVIN, D.A. On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. **New Phytologist**, v.210, p.391-398, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13698>

BASUMATARI, M.; DAS, B.N. Karyomorphological studies in two species of *Bauhinia* Linn. and induction of polyploidy in *Bauhinia acuminata* Linn. **International Journal of Life Sciences Research**, v.3, p.123-1229, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.4.20>

BLANCO, G.; TELLA, J. L.; DÍAZ-LUQUE, J. A.; HIRALDO, F. Multiple external seed dispersers challenge the megafaunal syndrome anachronism and the surrogate ecological function of livestock. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v.7, p.328, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00328>

CARDOSO, A. A.; BORGES, E. E. L.; SOUZA, G. A.; SILVA, C. J.; PIRES, R. M. O.; DIAS, D. C. F. S. Seed imbibition and germination of *Plathymania reticulata* Benth. (Fabaceae) affected by mercury: possible role of aquaporins. **Acta Botanica Brasilica**, v.29, p. 285-291, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062014abb0038>

CENIZA, M.S.; UEDA, S.; SUGIMURA, Y. In vitro culture of coconut endosperm: callus induction and its fatty acids. **Plant Cell Reports**, v.11, p.546-549. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00233089>

CHAO, D. Y.; DILKES, B.; LUO, H.; DOUGLAS, A.; YAKUBOVA, E.; LAHNER, B.; DE, S. Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. **Science**, v.341, p.658-659, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1240561>

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture. **Plant Cell Reports**, v.21, p.531-537, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0565-6>

CHEN, J.; TANG, X.; MA, X.; ZHAO, Q.; DONG, Z. Generation of a new polyploid grape cultivar by using hybrid seeds induced with colchicine. **Acta Horticulturae**, v.1046, p.251-258, 2014. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1046.32>

CHIKKANNAIAH, P. S.; GAYATRI, M. C. Organogenesis in endosperm tissue cultures of *Codiaeum variegatum* Blume. **Current Science**, v.43, p.23-24, 1974.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**. v.6, p.836-846, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg1711>

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; SANEWSKI, G. M.; SMITH, M. K.; DUVAL, M. F.; LEAL, F. Ananas. In KOLE, C. (Ed.) **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Tropical and Subtropical Fruits**. Heidelberg, Germany: Springer, 2013. p. 21-41. DOI: <https://doi.org/10.1007 / 978-3-642-14871-2>

CORNEILLIE, S.; DE ESTORME, N.; VAN ACKER, R.; FANGEL, J. U.; DE BRUYNE, M.; DE RYCKE, R.; GEELLEN, D.; WILLATS, W. G. T.; VANHOLME,

B.; BOERJAN, W. Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. **Plant Physiology**, v.179, p.74-87, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>

CZARNECKI, D. M.; HERSHBERGER, A. J.; ROBACKER, C. D.; CLARK, D. G.; DENG, Z. Ploidy Levels and Pollen Stainability of *Lantana camara* Cultivars and Breeding Lines. **Horticultural Science**, v.49, p.1271-1276, 2014. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.10.1271>

dEL POZO, J. C.; RAMIREZ-PARRA, E. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *Arabidopsis* autotetraploids. **Plant, Cell e Environment**. v.37, p.2722–2737, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12344>

DENG, B.; DU, W.; LIU, C.; SUN, W.; TIAN, S.; DONG, H. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? **Plant Growth Regulation**, vol. 66, pp. 37-47, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-011-9626-6>

dos SANTOS, R. C.; PEREIRA, M. C. T.; MENDES, D. S.; SOBRAL, R. R. S.; NIETSCH, S.; MIZOBUTSI, G. P.; DOS SANTOS, B. H. C. Gibberellic acid induces parthenocarp and increases fruit size in the 'Gefner' custard apple (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), **Australian Journal of Crop Science**, v.10, p.314-321, 2016. DOI: <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.03.p6911>

ELMAGHRABI, A. M.; OCHATT, S.; ROGERS, H. J.; FRANCIS, D. Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.114, p.61–70, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0306-2>

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.54, p.166-174, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9881-y>

GARG, L.; BHANDARI, N. N.; RANI, V.; BHOJWANI, S. S. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.855-858, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00233156>

GŁOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.88-96, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.03.009>

GMITTER, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 785-790, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224192>

GÓRALSKI, G.; POPIELARSKA, M.; SLESAK, H.; SIWINSKA, D.; BATYCKA, M. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured in vitro. **Acta Biologica cracoviensia: Series Botanica**, v.47, p.121-128, 2005.

GREER, B. T.; STILL, C.; CULLINAN, G. L.; BROOKS, J. R.; MEINZER, F. C. Polyploidy influences plant–environment interactions in quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.). **Tree Physiology**, v.38, p.630–640, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx120>

GROSSER, J. W.; KAINTH, D.; DUTT, M. Production of Colchicine-induced Autotetraploids in Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) through Indirect Organogenesis. **Horticultural Science**, v.49, p.944-948, 2014. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.7.944>

GUI, Y. L.; GU, S.R.; XU, T. Y. Differentiation of organ in endosperm culture of Chinese gooseberry. **In: International Symposium on Genetic Manipulation in Crops**, p. 84. Beijing: Science Press, 1982.

GURAGAIN, Y. N.; HERRERA, A. I.; VADLANI, P. V.; PRAKASH, O. Lignins of bioenergy crops: a review. **Natural Product Communications**, v.10, p.201-8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000141>

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, v.61, p.108-113. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000100018>

HINDANINGRUM, I. F.; WIENDI, N. M. A.; WIDODO, W. D. Pembentukan embrio endospermik sekunder mangga (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Klon 289. **Jurnal Agronomi Indonesia**, v.42, p.150-157, 2014.

HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.1-8, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.041>

JUNG, C.; MÜLLER, A. E. Flowering time control and applications in plant breeding. **Trends in Plant Science**, v.14, p.563–573, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.005>

KAGAN-ZUR, V.; MILLS, D.; MIZRAHI, Y. Callus formation from tomato endosperm. **Acta Horticulturae**, v.280, p.139-142, 1990. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.280.22>

KIN, M. S.; FRASER, L. G.; HARVEY, C. F. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, v.44, p.107-117, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90021-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90021-6)

KOSMIATIN, M.; PURWITO, A.; WATTIMENA, G. A.; MARISKA, I. Induksi Embriogenesis Somatik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. **Jurnal Agronomi Indonesia**, v.42, p.44-51, 2014.

KOSMIATIN, M.; HUSNI, A.; MARTASARI, C. Variasi stomata dari populasi mini grafting jeruk siam Medana (*Citrus nobilis*) yang diregenerasikan dari kultur Endosperma. **In: Prosiding Seminar Nasional II**, 2016, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang, 2016.

KOSMIATIN, M.; HUSNI, A. Perakitan varietas tanpa jeruk biji melalui pemuliaan konvensional dan nonkonvensional. **Jurnal Litbang Pertanian**, v. 37, p. 91-100, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.21082/jp3.v37n2.2018.p91-100>

KOSMIATIN, M.; MARTASARI, C.; KURNIAWATI, F. A.; PRASETIA, R. G. N.; DEWI, P. S. Analysis of stomata, chloroplast, and chromosome of local mandarin citrus (*Citrus reticulata*) plants grown from endosperm culture. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.406, p.1-10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/406/1/012010>

KUMAR, P. P.; RAJU, C. R.; CHANDRAMOHAN, M.; IYER, R. D. Induction and maintenance of friable callus from the cellular endosperm of *Cocos nucifera* L. **Plant Science**, v.40, p.203-207, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90204-3)

LI, Z.; RUTER, J. Development and Evaluation of Diploid and Polyploid *Hibiscus moscheutos*. **HortScience**, v.52, p.676-681, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21273/hortsci11630-16>

LIAO. T.; CHENG, S.; ZHU, X.; MIN, Y.; KANG, X. Effects of triploid status on growth, photosynthesis, and leaf area in *Populus*. **Trees**, v.30, p.1137–1147, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1352-2>

LIQIN, G.; JIANGUO, Z.; XIAOXIA, L.; GUODONG, R. Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. **Molecular Breeding**, v.39, p.69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0975-6>

LIU, S. C.; LIU, C. C. Callus induction and embryoid formation in endosperm cultures of *Prunus persica*. **Acta Botanica Sinica**, v.22, p.198-199, 1980.

LIU, C.; LIU, T.; OHLSON, E. W.; WANG, L.; WU, D.; GUO, O.; TIMKO, M. P.; LIANG, G. L. Loquat *Eriobotrya japonica* (Thunb.) circadian clock gene cloning and heterosis studies of artificial triploid loquat. **Scientia Horticulturae**, v.246, p.328-337, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.068>

LU, J.; QIN, P.Z.; HAN, X.; WANG, Y.P.; LI, Z.H. Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of extracts from *Trollius chinensis* Bunge. **European Food**

Research and Technology, v.240, p.301–310, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2329-2>

MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. **Heredity**, v.110, p.99-104, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.79>

MANZOOR, A.; AHMAD, T.; BASHIR, M. A.; HAFIZ, I. A.; SILVESTRI, C. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. **Plants (Basel)**, v.7, p.194, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8070194>

MASON, A.S.; NELSON, M.N.; YAN, G.; COWLING, W. A. Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. **BMC Plant Biology**, v.11, p.103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-103>

MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. R. C. Pineapple in Brazil: Characteristics, research and perspectives. **Acta Horticulturae**, v.822, p. 25-36, 2009. DOI: <https://doi.org/10.17660 / ActaHortic.2009.822.1>

MIKOVSKI, A. I.; SILVA, N. T.; SOUZA, C. S.; MACHADO, M. D.; OTONI, W. C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**, v.25, p.189-199, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v25i2.2036>

MIYASHITA, T.; OHASHI, T.; SHIBATA, F.; ARAKI, H.; HOSHINO, Y. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, p.291-301, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9562-6>

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.161-164, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00034851>

MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v.57, p.571-573, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000300033>

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin-auxin crosstalk. **Trends in Plant Science**, v.14, p.557-562, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.010>

MU, S. K.; LIU, S. C. Cytological observations on callus derived from apple endosperm cultured in vitro. In: **Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture**. Science Press, Peking, p.507–510, 1978.

MUÑOZ-CONCHA, D. Culture of triploid tissue from the endosperm of an endangered Chilean tree species *Gomortega keule*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.91, p.79-86, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.1110995>

NAIR, S.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Reports**, v.5, p.132-135, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00269252>

NAJAT, H.; BENYAHIA, H.; ARSALANE, N.; BENAOUA, H. Selection of new promising seedless mandarins triploid hybrids from crosses between monoembryonic diploid female and diploid male parentes. **Research in Biotechnology**, v.8, p.37-44, 2017. DOI: <https://doi.org/10.25081/rib.2017.v8.3598>

NAKEL, T.; TEKLEYOHANS, D. G.; MAO, Y.; FUCHERT, G.; VO, D.; GROß-HARDT, R. Triparental plants provide direct evidence for polyspermy induced polyploidy. **Nature Communications**, v.8, p.1033, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01044-y>

NAVARRO, L.; ALEZA, P.; CUENCA, J.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; ORTEGA, V. The mandarin triploid breeding program in Spain. **Acta Horticulturae**, v.1065, p.389-396, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.48>

NOVIKOVA, P. Y.; HOHMANN, N.; VAN DE PEER, Y. Polyploid *Arabidopsis* species originated around recent glaciation maxima. **Current Opinion in Plant Biology**, v.42, p.8–15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.005>

OSMAN, N. I.; SIDIK, N. J.; AWAL, A. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, p.143-147, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.10.007>

PADOAN, D.; MOSSAD, A.; CHIANCONE, B.; GERMANA, M. A.; KHAN, P. S. S. V. Ploidy levels in *Citrus clementine* affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, p.283-290. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S2197-00252013000400006>

PANDEY, V. P.; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U. N. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v.6, p.1-16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>

PANDOLFINI, T. Seedless fruit production by hormonal regulation of fruit. **Nutrients**, v.2, p.168-177, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu1020168>

PÄRNIK, T.; IVANOVA, H.; KEERBERG, O.; VARDJA, R.; NIINEMETS, Ü. Tree age-dependent changes in photosynthetic and respiratory CO₂ exchange in leaves of micropropagated diploid, triploid and hybrid aspen. **Tree Physiology**, v.34, p.585–594, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu043>

PHILLIPS, W.; RANNEY, T.; TOUCHELL, D. H.; EAKER, T. A. Fertility and reproductive pathways of triploid flowering pears (*Pyrus* sp.). **Horticultural Science**, v.51, p.968-971, 2016. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.8.968>

POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; KLESZCZ, I. Preliminary studies on plants regenerated from endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia Deliciosa* Var. *Deliciosa*). **Modern Phytomorphology** v.7, p.55–57, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.160362>

PREISIGKE, S. C.; SILVA, L. P.; SERAFIM, M. E.; BRUCKNER, C. H.; ARAÚJO, K. L.; NEVES, L. G. Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. **Summa Phytopathologica**, v.43, p.321-325, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/175390>.

RIMBERIA, F. K.; ADANIYA, S.; ISHIMINE, Y.; ETOH, T. Morphology of papaya plants derived via anther culture. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.213-219, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.015>

ROUISS, H.; BAKRY, F.; FROELICHER, Y.; NAVARRO, L.; ALEZA, P.; OLLITRAULT, P. Origin of *C. latifolia* and *C. aurantiifolia* triploid limes: the preferential disomic inheritance of doubled-diploid ‘Mexican’ lime is consistent with an interploid hybridization hypothesis. **Annals of Botany**, v.121, p.571-585, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcx179>

ROUNSAVILLE, T.; TOUCHELL, D. H.; RANNEY, T. Fertility and reproductive pathways in diploid and triploid *miscanthus sinensis*. **HortScience**, v.46, p.1353-1357, 2011. DOI:

SARI, R. A.; HERAWATI, R.; HERISON, C. Induction and growth of endosperm callus of Rimau Gerga Lebong (RGL) *Citrus* on several media composition. **Akta Agrosia**, v.22, p.56-62, 2019.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v.243, p.281–296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>

SATYAKI, P. R. V.; GEHRING, M. DNA methylation and imprinting in plants: machinery and mechanisms. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular**

Biology, v.52, p.163–175, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1279119>

SEHGAL, C. B.; KHURANA, S. Morphogenesis and plant regeneration from cultured endosperm of *Embllica officinalis* Gaertn. **Plant Cell Reports**, v.4, p.263-266, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00269373>

SETHI, M.; RANGASWAMY, N. S. Endosperm embryoids in cultures of *Nigella damascena*. *Current Science*, v.45, p.109-111, 1976.

SERAPIGLIA, M. J.; GOUKER, F. E.; HART, J. F.; UNDA, F.; MANSFIELD, S. D.; STIPANOVIC, A. J.; SMART, L. B. Ploidy level affects important biomass traits of novel shrub willow (*Salix*) hybrids. **BioEnergy Research**, v.8 p.259-269, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9521-x>

SHARMA, J.; KHAN, S.; VARMA, R.; PANDAY, A. In-Vitro endosperm culture and seedling growth of *Mallotus philippienes* (Lam.) M. Arg. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v.3, p.1385-1390, 2012.

SHIHKIN, M.; SHUCHIUNG, L. Cytological observation on callus derived from apple endosperm cultured in vitro. In: **Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture**, Science Press Peking, p.126-127, 1977.

SILVA, J. P.; COSTA, M. K. C.; ARAUJO, M. R. S.; ARAUJO, K. S.; SILVA, A. C. M.; COSTA, T. P. D.; OLIVEIRA, P. C.; SIA, E. F. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de Rosa sp. **Revista Agroecossistemas**, v.9, n.2, p.370-380, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v9i2.5097>

SIMON-PORCAR, V. I.; SILVA, J. L.; HIGGINS, J. D.; VALLEJO-MARIN, M. Recent autopolyploidization in a wild population of *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.185, p.189–207, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box052>

SORA, D.; KRON, P.; HUSBAND, B. C. Genetic and environmental determinants of unreduced gamete production in *Brassica napus*, *Sinapis arvensis* and their hybrids. **Heredity**, v.117, p.440-448, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.69>

SPOELHOF, J. P.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research. **Journal of Systematics and Evolution**, v.55, p.340-352, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12253>

SRIVASTAVA, P. S. In vitro Induction of Triploid Roots and Shoots from Mature Endosperm of *Jatropha panduraefolia*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.66, p.1-96, 1971.

SRIVASTAVA, P. S. Formation of triploid ‘Mantlets’ in endosperm cultures of *Putranjiva roxburghii*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.69, p.270-273, 1973. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(73\)80071-6](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(73)80071-6)

SUNYOTO, S.; PURNOMO, S.; MAKFUL, M. formula media kultur endosperm jeruk hasil persilangan antarklon siem dengan keprok dan jeruk besar. **Journal Hortikultura**, v.20, p.332-341, 2010.

SUKAMTO, L. A. Induksi tanaman cendana (*Santalum album* L.) triploid melalui kultur endosperma secara in vitro. **Widyariset**, v.14, p.393-398, 2011.

SUKMARA, E.; SUKAMTO, L. A.; BINTANG, M. Induksi dan karakter pertumbuhan kalus triploid dari endosperma avokad (*Persea Americana* Mill.). **Current Biochemistry Journal**, v.1, p.20-28, 2014.

SUMARJI, M. P.; SUPARNO, M. H. The effectiveness of colchisin giving on watermelon ploidization (*Citrullus vulgaris* Schard). **International Journal of Applied Environmental Sciences** v.12, p.1951-1967, 2017.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.23-29, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9795-4>

TANAKA, Y.; NOSE, T.; JIKUMARU, Y.; KAMIYA, Y. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. **The Plant Journal** v.74, p.448–457, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.12136>

TANAKA, Y.; KUMAGAI, E.; TAZOE, Y.; ADACHI, S.; HOMMA, K. Leaf photosynthesis and its genetic improvement from the perspective of energy flow and CO₂ diffusion. **Plant Production Science**, v.17, p.111–123, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1626/ppp.17.111>

TAO, R.; OZAWA, K.; TAMURA, M.; SUGIURA, A. Dodecaploid plant regeneration from endosperm culture of persimmon (*Diospyros kaki* L.). **Acta Horticulturae**, v.436, p.119-128. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.436.12>

THAMMINA, C.; HE, M.; LU, L.; CAO, K.; YU, L. In vitro regeneration of triploid plants of *Euonymus alatus* ‘Compactus’ (Burning Bush) from endosperm tissues. **HortScience**, v.46, p.1141-1147, 2011. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.8.1141>

TIAN, L.T.; KE, Y.N.; GAN, S.R.; CHEN, Y.Q.; CHEN, Y.; YANG, Z.F.; WANG, X.G. Triploid plant regeneration from mature endosperms of *Sapium sebiferum*. **Plant Growth Regulator**, v.68, p.319–324, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9720-4>

TIKU A.R.; RAZDAN M.K.; RAINA S.N. Production of triploid plants from endosperm cultures of *Phlox drummondii*. **Biologia Plantarum**, v.58, p.153–158, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0372-7>

THANG, B. V.; VIET, N. V.; NAM, V. Q.; HOANG, T. T.; NHUT, D. T. Triploid plant regeneration from immature endosperms of *Melia azedazach*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.133, p.351-357, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1387-8>

THOMAS, T. D.; BHATNAGAR, A. K.; BHOJWANI, S. S. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L) by endosperm culture. **Plant Cell Reports**, v.19, p.395-399, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050746>

THOMAS, T. D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, p.1–14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>

TSUKAYA, H. The leaf index: heteroblasty, natural variation and the genetic control of polar processes of leaf expansion. **Plant and Cell Physiology**, v.43, p.372-378, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf051>

USMAN, M.; FATIMA, B.; GILLANI, K. A.; KHAN, M. S.; KHAN, M. M. Exploitation of potential target tissues to develop polyploids in citrus. **Pakistan Journal Botany**, v.40, p.1755-1766, 2008.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v.18, p.411–424, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>

VICHIATO, M. R. D. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CASTRO, D. M. D. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, n. 3, p. 154-159, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a23>

WANG, T. Y.; CHANG, C. J. Triploid *Citrus* plantlet from endosperm culture. **Scientia Sinica**, v.21, p.463–467, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1360/ya1978-21-6-823>

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**, v.52, p.41–54, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17221/151/2015-CJGPB>

WENDEL, J. F.; JACKSON, S. A.; MEYERS, B. C.; WING, R. A. Evolution of plant genome architecture. **Genome Biology**, v.17, p.1-14, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0908-1>

WINARTO, B.; SOEHENDI, R.; HARWANTO. An in vitro endosperm culture of *Anthurium*. **Advances in Agricultural Science**, v.6, p.13-25, 2018.

XIE, K. D.; YUAN, D. Y.; WANG, W.; XIA, Q. M.; WU, X. M.; CHEN, C. W.; CHEN, C.; GROSSER, J. W.; GUO, W. W. Citrus triploid recovery based on $2x \times 4x$ crosses via an optimized embryo rescue approach. **Scientia Horticulturae**, v.252, p.104-109, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.038>

YE, Y. M.; TONG, J.; SHI, X.P.; YUAN, W.; LI, G.R. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Scientia Horticulturae**, v.124, p.95-101, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.016>

ZHANG, J. Y.; HE, S. B.; LI, L.; YANG, H. Q. Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in mesophyll. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.111, p.3015–3023, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1400542111>

ZHANG, N.; BAO, Y.; XIE, Z.; HUANG, X.; SUN, Y.; FENG, G.; ZENG, H.; REN, J.; LI, Y.; XIONG, J.; CHEN, W.; YAN, C.; TANG, M. Efficient Characterization of Tetraploid Watermelon. **Plants**, v.8, p.419, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8100419>

ZHAO, H. Induction of endosperm plantlets of “Jinfeng” pear in vitro and their Ploidy. **In: Genetic Manipulation of Crops**. p.123–124, 1988.

CAPÍTULO II

Regeneração in vitro e caracterização morfoagronômica em plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast

1. INTRODUÇÃO

A produção de plantas poliplóides é uma estratégia importante em programas de seleção e melhoramento de plantas (Sumarji; Suparno, 2017; Winarto et al., 2018). A indução da poliploidia aumenta significativamente a diversidade morfológica das plantas. O tamanho aumentado de muitos poliploides em relação aos pais diploides tem sido particularmente útil na criação de plantas ornamentais com flores maiores e mais vistosas. Dentre os poliploides, as plantas triploides geralmente apresentam crescimento vegetativo vigoroso, folhas e flores maiores, maior tempo de floração, fragrância e vida útil na pós colheita (Comei, 2005; Liao et al., 2016; Basumatari e Das, 2017), resistência a ataque de pragas, doenças e ao estresse hídrico (Wang et al., 2016; Nakel et al., 2017; Liqin et al., 2019).

Os poliploides podem ser gerados eventualmente em populações naturais de plantas com flores ou por meios sintéticos, através da hibridação artificial, fusão de protoplasto e da regeneração do endosperma (Wang et al., 2016; Nakel et al., 2017; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018). Dentre os poliploides os triploides carregam uma cópia genética extra com três conjuntos de cromossomos em um organismo ou linhagem celular denominado $3x=3n$ (Alam et al., 2015; Sattler et al., 2016), que modifica a expressão gênica das características funcionais, estruturais e fenotípicas das plantas (Van de Peer et al., 2017).

As alterações fenotípicas e genéticas em plantas triploides podem ocorrer devido a produção de células somáticas maiores (Sattler et al., 2016; Manzoor et al., 2019), que aumenta o conteúdo nuclear e causa redução na divisão celular durante seu crescimento e desenvolvimento (Simon-Porcar et al., 2017) e à economia de energia fotossintética, pois a energia normalmente usada na formação e desenvolvimento das sementes é revertida para o crescimento vegetativo (Miyashita et al., 2009; Hoshino et al., 2011; Tikun et al., 2014).

O cultivo in vitro do tecido endospermico consiste em um sistema direto para produção de plantas triploides (Thomas; Chaturvedi, 2008; Kosmiatin; Husni, 2018; Mikovski et al., 2019). A regeneração in vitro do endosperma se baseia principalmente na via organogênica e foi reportado com sucesso em plantas frutíferas e ornamentais, como em *Actinidia* spp. (Kin et al., 1990; Góralski et al., 2005; Asakura; Hoshino, 2017), *Citrus* spp. (Gmitter et al., 1990), *Carica papaya* (Sun et al., 2011), *Gomortega keule* (Muñoz-Concha, 2016), *Acacia nilotica* (Garg et al., 1996), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003), *Anthurium andreanum* (Winarto et al., 2018), *Melia azedazach* (Thang et al., 2018) e *Passiflora* spp. (Mohamed et al., 1996; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018), demonstrando que plantas triploides podem ser produzidas a partir de endospermas de plantas diploides. Entretanto, a obtenção de plantas triploides pela via embriogênica ainda é incipiente. A via de regeneração embriogênica se concentra principalmente no cultivo in vitro de espécies frutíferas arbóreas de interesse comercial, como o *Citrus nobilis* Lour. cv Simadu (Kosmiatin et al., 2014), *Mangifera indica* L (Hindaningrum et al., 2014) e *Persea americana* (Sukmara et al., 2014).

Passiflora cincinnata Masters é uma importante espécie silvestre de maracujazeiro tolerante a seca (Rybka et al., 2016), que tem sido utilizada frequentemente como porta enxerto para *P. edulis* por manifestar resistência ao nematoide *Meloidogyne* sp., a bactéria *Xanthomonas campestris* f. sp. *Passiflorae* e resistência moderada ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Oliveira; Ruggiero, 2005; Viana et al., 2010; Alexandre et al., 2013; Preisigke et al., 2017). A espécie apresenta potencial econômico de uso alimentício, cosmético, medicinal e ornamental, mas a exploração econômica ainda é restrita devido a inexistência de plantas selecionadas para o cultivo em escala comercial (Delmondes et al., 2014; Araújo et al., 2018; Siebra et al., 2018).

Considerando a potencialidade do uso de *P. cincinnata*, o presente trabalho objetivou a obtenção de plantas triploides por meio da regeneração do endosperma a partir da embriogênese somática e a caracterização morfoagronômica das plantas regeneradas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e indução da embriogênese somática

Sementes de *P. cinnamomum* foram isoladas de frutos maduros e, após a retirada do arilo, foram secadas ao ar livre. Com auxílio de uma mini morsa, removeu-se o tegumento das sementes (Reis et al., 2007). Logo após, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por três minutos, seguido em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) durante 25 minutos acrescido de 3 gotas do agente surfactante de Tween-20 em 100 mL de solução. Após, as sementes foram enxaguadas por quatro vezes em água destilada e autoclavada e mantidas em overnighht para facilitar o isolamento dos endospermas.

Os endospermas foram isolados assepticamente dos embriões zigóticos e cultivados em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm contendo 30 mL do meio de indução composto por sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) (Acumedia®) 4,5% (p/v), mio-inositol 0,01% (p/v), sacarose 3% (p/v) e 8 gL⁻¹ de ágar (p/v) como agente gelificante, acrescido da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e da citocinina benziladenina (BA). As concentrações dos reguladores de crescimento para a indução da embriogênese foram com 4,5 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 9,0 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 13,6 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 18,1 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 22,6 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 27,1 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 31,7 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 36,2 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 40,7 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA, 45,2 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA e o controle na ausência adição do regulador de crescimento. O pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1 e o meio de cultura foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C a uma pressão de 1,1 atm. Os endospermas inoculados nas placas de Petri foram cultivados em sala de cultivo por 30 dias, na ausência de luz, a temperatura de 25 ± 2 °C.

Massas pró-embriogênicas com 30 dias de cultivo in vitro foram transferidas para histodiferenciação em placas contendo meio MS½ na metade das concentrações, como descrito anteriormente, sem adição de reguladores. As culturas foram mantidas sob luminosidade com fotoperíodo de 16 horas e 36 µmol m⁻²s⁻¹ de irradiância providas de lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), na temperatura

e condições de crescimento descritas anteriormente até a conversão dos embriões somáticos em plantas.

2.2 Conversão das plantas e aclimatização

Aos 45 dias de cultivo em vitro, embriões somáticos em estágio de desenvolvimento cotiledonar foram isolados e cultivados em frascos de cultivo em meio de MS^{1/2} na metade das concentrações dos sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) (Acumedia®) (p/v), mio-inositol 0,01% (p/v), sacarose 3% (p/v) e 8 gL⁻¹ de ágar (p/v) como agente gelificante, sem adição de reguladores de crescimento. Aos 90 dias de cultivo plântulas completas com aproximadamente 10 cm de comprimento foram obtidas. Após foram transferidas para copos plásticos contendo substrato Plantmax®. Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes, permanecendo incubadas sob fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 26 ± 2 °C por aproximadamente 20 dias e, após foram levadas para casa de vegetação e os sacos plásticos removidos gradativamente durante 10 dias.

2.3 Determinação do conteúdo de DNA

O conteúdo de DNA foi determinado com o uso de citometria de fluxo, com três amostras dos explantes endospermicos, das plantas germinadas in vitro pela via seminífera como controle, das plantas regeneradas pela via embriogênica a partir do endosperma de *P. cincinnata* e como padrão a espécie *Pisum sativum*.

As suspensões de núcleos foram obtidas através de secções de folhas jovens com o uso de uma lâmina de aço descartável em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com uma pipeta de plástico e filtrada em membrana de Nylon com malha de 50 µm para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos, sendo em seguida adicionado 25 µL de iodeto de propídio 1 mg mL e 5 µL de RNase 1 mg mL para corar o DNA.

Após 30 minutos em ambiente protegido de luz as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Foram realizadas três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Como padrão interno, foi

utilizada a espécie *Pisum sativum* com conteúdo de DNA 2C = 9.09 pg (Dolezel et al., 1998). Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA (pg) calculado de acordo Dolezel e Bartos (2005):

Sample (2C DNA)

$$\frac{G1 \text{ peak channel of sample} \times 9.09 \text{ (} P. \text{ sativum DNA content)}}{G1 \text{ peak channel of } P. \text{ sativum}}$$

2.4 Análise cromossômica

As análises cromossômicas foram realizadas utilizando-se de três plântulas germinadas a partir de sementes (controle) e três plântulas regeneradas do cultivo in vitro dos endospermas de *P. cincinnata* regeneradas pela via embriogênica.

Ápices radiculares de aproximadamente 1,5 cm foram coletados e tratados com 0,003 M 8 hidroxiquinolina (Sigma, EUA) por 8 horas a 4 °C, e posteriormente fixados em solução de Carnoy (3:1 etanol: ácido acético glacial) e armazenadas em um refrigerador por 24 horas. Após, o material foi lavado em água destilada e digerido com uma solução enzimática de 4% de celulase Onozuka R10 (Yakult, Japão) e 1% de pectinase (Sigma, EUA) diluída em tampão citrato a 37 °C por 3 horas. As lâminas foram confeccionadas com a técnica de secagem ao ar livre (Carvalho e Saraiva, 1993) e coradas com 40-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, EUA). Os materiais foram analisados em microscópio Olympus BX51.

2.5 Caracterização morfoagronômica

Para a caracterização morfoagronômica dez plantas triploides completas de *P. cincinnata* com aproximadamente 25 cm foram transferidas para vasos plásticos de 30 dm³ preenchidos com uma mistura de solo e substrato, na proporção 3:1, cultivados em casa de vegetação. Para o controle, sementes de *P. cincinnata* foram germinadas em sacos plásticos pretos de polietileno de 28 x 14 cm, contendo substrato Plantmax, mantidas em casa de vegetação sendo irrigadas diariamente. Dez plantas com aproximadamente 25 cm também foram cultivadas em vasos plásticos de 30 dm³, com a mesma proporção de solo e substrato das plantas triploides.

Os vasos foram espaçados com 1,5 m entre linhas e 4 m entre plantas. O sistema de condução foi em espaldadeira vertical com fio de arame liso a 1,8 m de altura, sem eliminação dos brotos terminais e dos ramos laterais.

A caracterização morfoagronômica das plantas em estudo foram baseadas em listas de descritores para a cultura do maracujazeiro de acordo com Jesus et al. (2015), as instruções para ensaios de DHE (distinguilidade, homogeneidade e estabilidade), as quais consta uma lista com 35 descritores morfoagronômicos proposta pelo Serviço Nacional de Proteção de cultivares (BRASIL, 2016) para espécies silvestres, ornamentais e híbridos interespecíficos do gênero *Passiflora*, e os propostos por Fonseca et al. (2017) e Nobrega et al. (2017). Ao total, foram avaliados em cada planta 57 descritores, sendo 29 quantitativos e 28 qualitativos (Tabela 1 e 2). Os descritores foram avaliados com base nas estruturas encontradas no terço médio de cada planta. Para definição da classe fenotípica de cada descritor, foram analisadas 10 folhas e flores de cada planta e 1 fruto por planta. A classe fenotípica foi obtida pela análise individual de cada planta avaliada, sendo posteriormente transformado em porcentagem para enquadramento nas categorias.

A mensuração das características quantitativas foi realizada com auxílio de um paquímetro digital e de um refratômetro analógico (Akrom) para quantificação do °brix da câmara nectarífera (cavidade interna da coroa), conforme a necessidade de avaliação do descritor e em seguida, atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores obtidos para cada planta.

Os descritores quantitativos também foram analisados separadamente. Para tais análises quantitativas, foi utilizado a média das 10 repetições de cada nível de ploidia (3n) e (2n), sendo que cada repetição é a média de 10 medidas de estruturas (folhas e flores) de cada planta.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade (Bartlett) e, se a distribuição for normal, utilizará o teste t de Student para verificar diferença significativa entre os resultados médios dos tratamentos. Se os dados não apresentarem a distribuição normal, serão transformados em escala logarítmica. Após a transformação logarítmica, em padrão assimétrico serão submetidos ao teste não paramétrico com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013).

Tabela 1. Descritores da planta e folha e classes fenotípicas (categoria) avaliados para *P. cincinnata*.

Descritores da planta e folhas	Caracteres	Categoria
CPR: Coloração predominante do ramo	Qualitativo	1- Verde-clara 2- Verde-escura 3- Verde-arroxeadada 4- Roxa
FHE: Formato da haste	Qualitativo	1- Cilíndrica 2- Angulada 3- Alada
DIH: Diâmetro da haste	Quantitativo	Medida obtida em cada planta 1- Ausente
PAR: Presença de antocianina nos ramos	Qualitativo	2- Pouca (mais verde que roxo) 3- Média (mais roxo que verde; verde-arroxeadada) 4- Alta (totalmente roxo-avermelhada)
CLF: Comprimento do limbo foliar	Quantitativo	1- Muito curto (<4cm) 2- Curto (4 a 8cm) 3- Médio (8 a 12cm) 4- Longo (12 a 16cm) 5- Muito longo (>16cm)
LLF: Largura do limbo foliar	Quantitativo	1- Muito curto (<4cm) 2- Curto (4 a 8cm) 3- Médio (8 a 12cm) 4- Longo (12 a 16cm) 5- Muito longo (>16cm)
PSL: Profundidade dos sinus do limbo foliar	Qualitativo	1- Ausente 2- Rasa 3- Média 4- Profunda
FOF: Formato do limbo foliar	Qualitativo	1- Lanceolada 2- Ovada 3- Cordada 4- Oblonga 5- Elíptica 6- Fendida 7- Partida 8- Seccionada
DLF: Divisão do limbo foliar	Qualitativo	1- Inteira 2- Bilobada 3- Trilobada 4- Pentalobada 5- Hexalobada
PHE: Presença de heterofilia	Qualitativo	1- Ausente 2- Presente
COF: Coloração da folha	Qualitativo	1- Verde-clara 2- Verde 3- Verde-escura 4- Outra
FBF: Forma da base foliar	Qualitativo	1- Arredondada 2- Truncada 3- Atenuada 4- Subcordada 5- Cordada 6- Hastada 7- Digitiforme 8- Aguda

FAF: Forma do ápice foliar	Qualitativo	1- Arredondado 2- Atenuado 3- Cuspidado 4- Acuminado 5- Agudo
NNE: Número de nectários no limbo foliar	Quantitativo	1- Ausente (0) 2- Pouco (1-2) 3- Mediano (>2-4) 4- Elevado (>4)
PON: Posição dos nectários	Qualitativo	1- Ausente 2- Basilaminar 3- Laminar 4- Marginal 5- Nerviaxilar 6- Apical
CPL: Comprimento do pecíolo	Quantitativo	1- Muito curto (<2 cm) 2- Curto (2 a 3cm) 3- Médio (>3 a 4cm) 4- Longo (>4cm)
NNP: Número de nectários no pecíolo	Quantitativo	1- Ausente (0) 2- Pouco (1-2) 3- Mediano (>2-4) 4- Elevado (>4)
PNP: Posição dos nectários no pecíolo	Qualitativo	1- Ausente 2- Adjacente ao limbo foliar 3- Próximo ao meio do pecíolo 4- Adjacente à inserção da folha no ramo 5- Distribuídos ao longo do pecíolo

Tabela 2. Descritores da flor e classes fenotípicas (categoria) avaliados para *P. cincinnata*.

Descritores da flor	Caracteres	Categoria
DAH: Diâmetro do hipanto	Quantitativo	Média de 10 flores por planta
HAF: Horário e tempo de abertura das flores	Quantitativo	Pré antese até fechamento total de 4 flores por planta
COB: Comprimento da bráctea	Quantitativo	1- Curto (<2 cm) 2- Médio (2 a 4 cm) 3- Longo (>4 cm)
LAB: Largura da bráctea	Quantitativo	1- Curto (<2 cm) 2- Médio (2 a 4 cm) 3- Longo (>4 cm)
NUB: Número de brácteas	Qualitativo	1- Dois 2- Três 3- Quatro
NNB: Número de nectários na bráctea	Quantitativo	1- Ausente (0) 2- Pouco (1) 3- Mediano (2-4) 4- Elevado (>4)
COS: Comprimento da sépala	Quantitativo	1- Curto (<3cm) 2- Médio (3-6cm) 3- Longo (>6cm)
LAS: Largura da sépala	Quantitativo	1- Estreita (<1 cm) 2- Média (1 a 2 cm) 3- Larga (> 2 cm)
NUS: Número de sépalas	Qualitativo	1- Três 2- Quatro 3- Cinco

NNS: Número de nectários na sépala	Quantitativo	1- Ausente (0) 2- Pouco (1) 3- Mediano (2-4) 4- Elevado (>4)
CMA: Comprimento do androginóforo	Quantitativo	1- Muito curto (<0,5cm) 2- Curto (0,5–1cm) 3- Médio (>1–2cm) 4- Longo (>2–3cm) 5- Muito longo (>3cm)
DEA: Diâmetro da extremidade da coroa	Quantitativo	1- Muito pequeno (<3 cm) 2- Pequeno (3 – 6 cm) 3- Médio (>6 – 9 cm) 4- Grande (>9 – 12 cm) 5- Muito grande (>12 cm)
BFC: Bandeamento nos filamentos mais longos da coroa	Qualitativo	1- Ausente 2- Presente
NAC: Número de anéis coloridos nos filamentos da coroa	Quantitativo	1- Ausente 2- Um 3- Mais de um
CAC: Coloração predominante dos filamentos da coroa	Qualitativo	1- Branca 2- Rosa 3- Roxa 4- Verde 5- Amarela 6- Vermelha
CFC: Comprimento dos anéis do filamento da coroa	Quantitativo	1- Ausente (única cor) 2- Estreita (<1cm) 3- Média (1–1,5cm) 4- Larga (>1,5cm)
DEC: Diâmetro externo da cavidade da coroa	Quantitativo	Média de dez flores por planta
DIC: Diâmetro interno da cavidade da coroa	Quantitativo	Média de dez flores por planta
COP: Comprimento da pétala	Quantitativo	1- Curto (<2 cm) 2- Médio (2-4 cm) 3- Longo (>4 cm)
LAA: Largura da pétala	Quantitativo	1- Estreita (<0,5cm) 2- Média (0,5–1cm) 3- Larga (>1cm)
NUP: Número de pétalas	Qualitativo	1- Três 2- Quatro 3- Cinco
CFE: Coloração dos filamentos erectos da coroa	Qualitativo	1- Ausente 2- Branca 3- Branca + rosa 4- Branca + roxa 5- Roxa
FLC: Filamento mais longo da coroa	Qualitativo	1- Lisos 2- Ondulados
PPA: Período predominante da antese	Quantitativo	1- Matutino 2- Vespertino 3- Noturno
CPP: Coloração predominante no perianto	Qualitativo	1- Branca 2- Rosada 3- Vermelha 4- Vermelha-arroxeadada 5- Roxa 6- Azul-arroxeadada 7- Azul 8- Outro

CMP: Comprimento do pedúnculo	Quantitativo	1- Curto (<2cm) 2- Médio (2-4cm) 3- Longo (>4cm)
COA: Comprimento da antera	Quantitativo	1- Curto (<0,5cm) 2- Médio (0,5-1cm) 3- Longo (>1cm)
LAA: Largura da antera	Quantitativo	1- Estreita (<1,5mm) 2- Média (1,5mm-3,0mm) 3- Larga (>3,0mm)
NAN: Número de anteras	Qualitativo	1- Três 2- Quatro 3- Cinco 4- Seis
PAA: Presença de antocianina no dorso da antera	Qualitativo	1- Ausente 2- Poucos pontos 3- Muitos pontos 4- Outros
COV: Comprimento do ovário	Quantitativo	1- Curto <4mm) 2- Médio (4-8mm) 3- Longo (>8mm)
DIO: Diâmetro do ovário	Quantitativo	1- Estreita <1,5mm) 2- Média (1,5-3mm) 3- Larga (>3mm)
PAF: Presença de antocianina no filete	Qualitativo	1- Ausente 2- Poucos pontos 3- Muitos pontos
PAE: Presença de antocianina no estilete	Qualitativo	1- Ausente 2- Poucos pontos 3- Muitos pontos
PAA: Presença de antocianina no androginóforo	Qualitativo	1- Ausente 2- Poucos pontos 3- Muitos pontos
NUE: Número de estigma	Qualitativo	1- Dois 2- Três 3- Quatro
CFI: Comprimento do filete	Quantitativo	Média de 10 flores por planta
CES: Comprimento do estilete	Quantitativo	Média de 10 flores por planta
CBB: Concentração de brix botão floral	Quantitativo	Média de 10 flores por planta

2.6 Análise da viabilidade polínica

A viabilidade do pólen foi realizada em botões florais de *P. cincinnata* diploides e triploides, de acordo com Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1970) com pequenas modificações. As anteras maduras e frescas foram excisadas e coradas com diacetato de fluoresceína dissolvido em acetona (2 mg mL) combinado com 10% de sacarose durante 30 minutos. O pólen fluorescente foi considerado viável e os não fluorescentes como inviáveis. Aproximadamente 1.060 grãos de pólen foram analisados, quantificados em três lâminas, em pelo menos 20 campos aleatórios com auxílio de um microscópio BX 51 (Olympus) com filtro apropriado no aumento de 20x. As imagens foram digitalizadas usando o software CellSens (Olympus).

3. RESULTADOS

3.1 Regeneração in vitro do tecido endospermico e confirmação da triploidia

Endospermas de *P. cincinnata* utilizados como explante (Figura 1A), apresentaram respostas morfogênicas quando cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D + BA. Inicialmente, os endospermas que adquiriram competência embriogênica, apresentaram intumescimento e sucessivas divisões que levaram a sua expansão. Massas pró-embriogênicas de coloração amarelada foram observadas principalmente nos tratamentos com 18,1 μM de 2,4-D + 4,5 μM de BA, na ausência de irradiância. Aos 15 dias de cultivo in vitro já se pôde observar a diferenciação celular do embrião somático (Figura 1B).

As culturas embriogênicas aos 30 dias de cultivo foram transferidas para meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento, sob irradiância e já se observa formação de embriões somáticos de forma indireta em estágio cotiledonar e, aos 45 dias há proliferação e o desenvolvimento de embriões secundários ocorrendo a diferenciação de embriões somáticos no estágio cotiledonar (Figura 1C-D). Aos 90 dias plântulas completas foram obtidas e, com 210 dias, plantas de origem a partir do tecido endospermico cultivadas em casa de vegetação floresceram (Figura 1E-F).

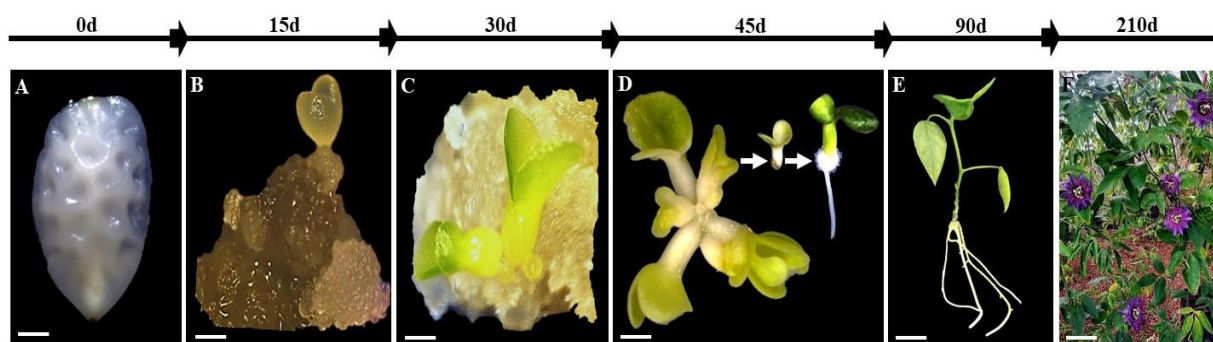


Figura 1. Sistema de regeneração in vitro a partir de tecido endospermico maduro isolado como fonte de explante para obtenção de plantas triploides em *P. cincinnata* através da embriogênese somática. (A) Explante endospermico utilizado para a regeneração in vitro de *P. cincinnata* Bar. 20 μm ; (B) Indução de embrião somático no estágio cordiforme a partir de endosperma aos 15 dias de cultivo de MS suplementado com 18,1 μM 2,4-D e 4,5 μM BA. Bar. 40 μm ; (C-D) Maturação dos embriões somáticos no estágio cotiledonar após 30 e 45 dias, respectivamente, em meio MS $\frac{1}{2}$ sob irradiância. Bar. 80 μm e 90 μm ; (E) Plântula triploide regenerada a partir do endosperma aos 90 dias de cultivo. Bar. 5mm; (F) Planta triploide de *P. cincinnata* em plena floração após 210 dias de cultivo em casa de vegetação. Bar. 100mm.

O maior potencial de indução da embriogênese somática a partir do tecido endospermico ocorreu na combinação das concentrações de 18,1 μM de 2,4-D + 4,5 μM de BA, com número médio de 9 (nove) embriões por endosperma, apresentando resultados significativamente superior ao tratamento com de 13,6 μM de 2,4-D e 4,5 μM BA, que produziu número médio de 2 (dois) embriões por endosperma. O tratamento controle MS com ausência dos reguladores de crescimento não proporcionou a formação de respostas embriogênicas.

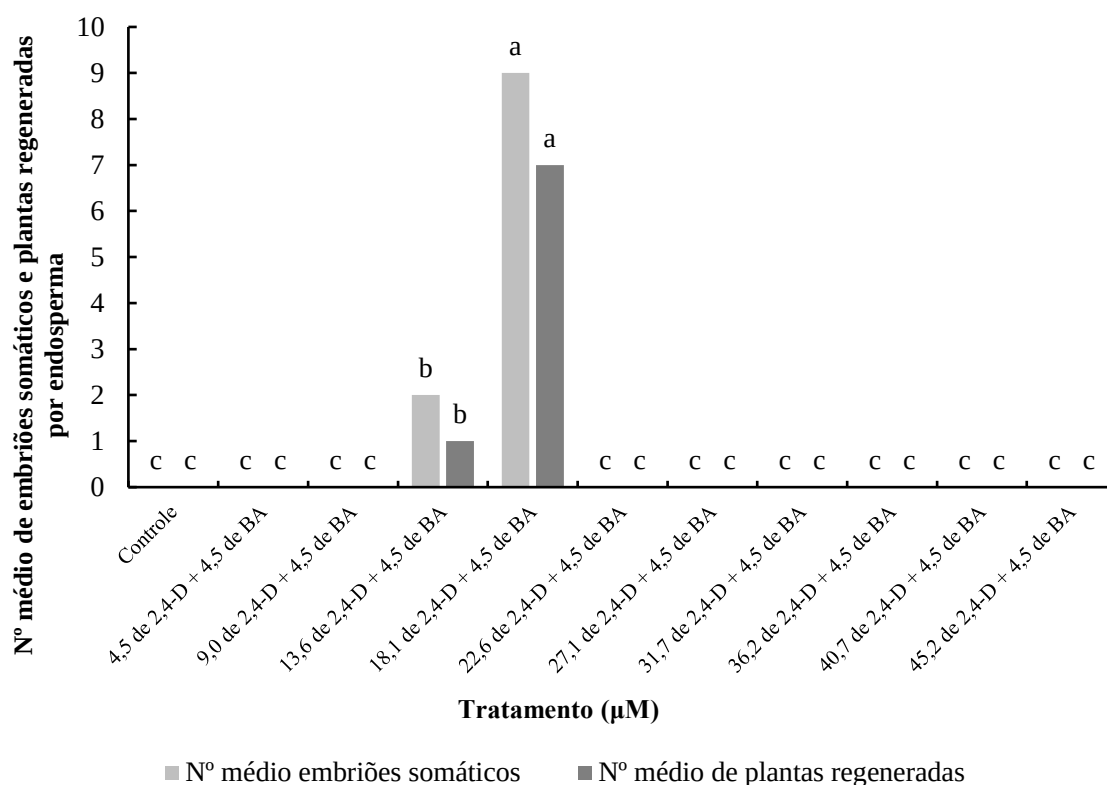


Figura 2. Número médio de embriões somáticos por endosperma com 45 dias e de plantas regeneradas por endosperma de *P. cincinnata* aos 90 dias de cultivo in vitro.

Após o isolamento dos embriões e o cultivo em meio de MS na ausência de reguladores de crescimento, foi possível a regeneração de plantas nos dois tratamentos com reguladores de crescimento (Figura 2). Plantas completas de aproximadamente 10 cm foram consideradas regeneradas. O maior número médio de plantas regeneradas foi nos endospermas cultivados na presença de 18,1 μM de 2,4-D e 4,5 μM de BA, apresentando 7 (sete) plantas regeneradas por endosperma. As plantas regeneradas foram aclimatadas sob condições de casa de vegetação.

A confirmação através da citometria de fluxo da triploidia das plantas regeneradas in vitro pela via embriogênica estão representadas na Figura 3A-B. A quantidade de DNA da planta controle foi de 2,98 pg para plantas germinadas a partir de semente, com coeficiente de variação de 2,6% (Figura 3A). As plantas regeneradas in vitro a partir do endosperma foi de 4,38 pg e o coeficiente de variação de 2,8% e a planta padrão *P. sativum* 9,09 pg (Figura 3B). O número cromossômico das plantas diploides de *P. cincinnata* originadas a partir de sementes foi de 18 cromossomos ($2n=2x=18$) (Figura 3C) e das plantas regeneradas a partir do endosperma pela via embriogênica foi igual a 27 ($3n=3x=27$) (Figura 3D). As análises da citometria de fluxo e do número cromossômico confirmaram a triploidia das plantas regeneradas in vitro.

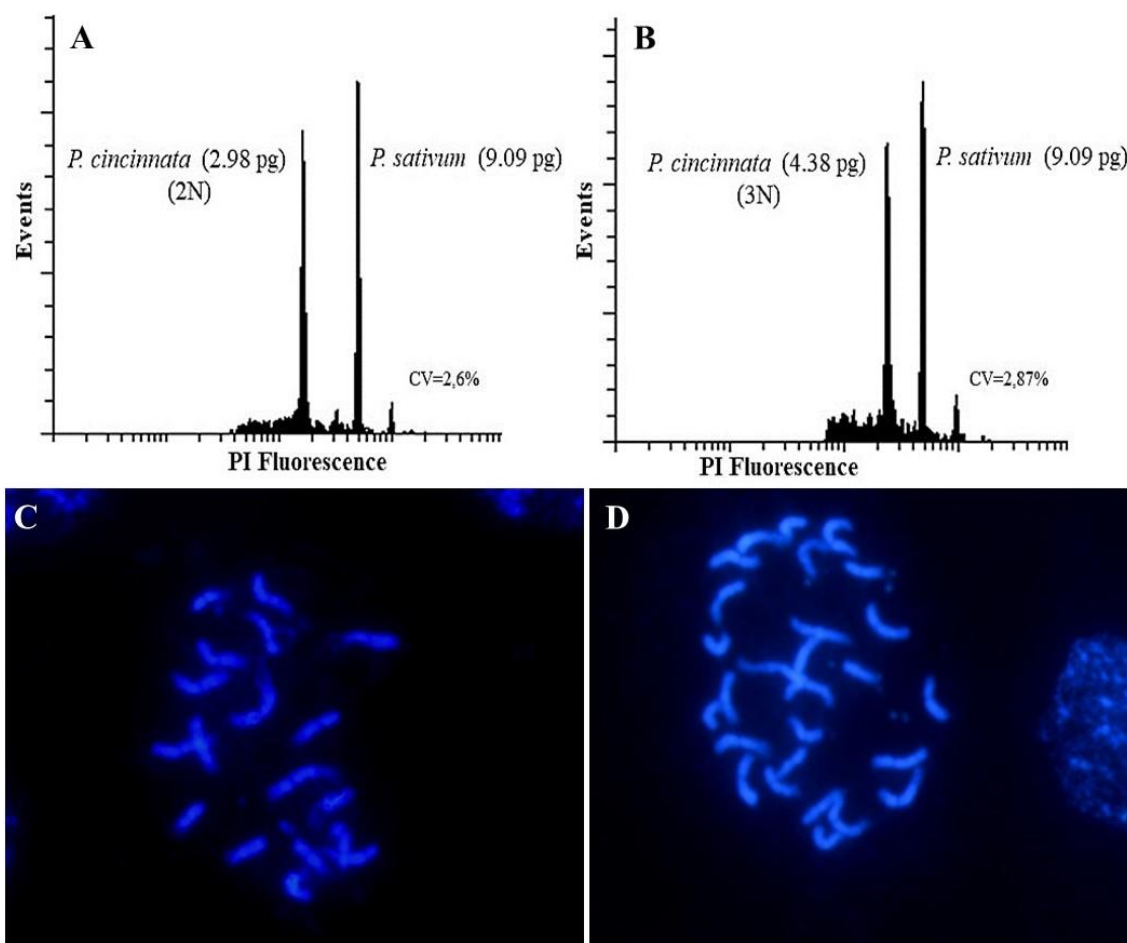


Figura 3. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear através das análises de citometria de fluxo em plantas (2n) e (3n) de *P. cincinnata* e avaliação cromossômica. (A) Histograma do conteúdo de DNA nuclear de plantas germinadas de semente; (B) Histograma do conteúdo de DNA nuclear de plantas regeneradas in vitro a partir do tecido endospermico de *P. cincinnata*; (C) Número de cromossomos de plantas derivadas de sementes de *P. cincinnata* ($2n = 2x = 18$); (D) Número de cromossomos derivado de plantas regeneradas de endosperma ($3n = 3x = 27$).

3.2 Caracterização morfoagronômica de plantas triploides

Dos 57 descritores das classes fenotípicas avaliados, 45 apresentaram diferenças na caracterização morfoagronômica entre as plantas triploides obtidas a partir do tecido endospermico, regenerados pela via embriogênica, e os seus respectivos diploides.

Os descritores morfoagronômicos avaliados e a frequência das classes fenotípicas das plantas e das folhas dos diploides e triploides estão descritas na Tabela 3. A coloração predominante dos ramos das plantas diploides de *P. cincinnata* foi verde-escura, com hastes cilíndricas de diâmetro médio de 7,62 mm (Tabela 4). As folhas são de coloração verde, inteiras, trilobadas e pentalobadas, na maior parte seccionadas (Figura 4A), com tamanho médio entre 128,8 - 165,7 mm e largura média de 162,2 - 180,7 mm, de sinus profundo com 3,21 nectários, com pecíolos de comprimento médio, variando de 37,79 - 50,51 mm, nectários em números mediano, entre 1,9 a 2,0, localizados adjacentes a inserção da folha do ramo.

As plantas triploides de *P. cincinnata* exibem ramos com coloração variando entre verde-escura a verde-arroxeadada (Tabela 3), com haste cilíndrica de diâmetro médio de 8,46 mm, e as folhas possuem uma variação em formatos desde inteira a pentalobada, entretanto, em sua maioria são trilobadas (Figura 4B), de coloração verde a verde-escura, com sinus profundo, seccionada de tamanho variando entre 160,2 a 180,7 mm, largura média de 190,7 - 211,8 mm com nectários em número médio de 3,71. Os pecíolos apresentam comprimento médio de 50,95 mm, variando entre 40,54 - 56,74 mm, com nectários localizando-se adjacentes ao limbo foliar e à inserção da folha no ramo, em número médio de 2,12 (Tabela 4).

Tabela 3. Descritores avaliados e frequência das classes fenotípicas (categoria) avaliados em 10 plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*.

Descritores da planta e folhas	Categoria	Frequência (%) Diploide	Frequência (%) Triploide
CPR	2- Verde-escura	2 (100%)	2 (30%)
	3- Verde-arroxeadada		3 (70%)
FHE	1- Cilíndrica	1(100%)	1 (100%)
PAR	2- Pouca (mais verde que roxo)	2 (100%)	2 (50%)
	3- Média (mais roxo que verde; verde-arroxeadada)		3 (50%)
CLF	1- Muito curto (<4cm)	1 (2%)	4 (11%)
	4- Longo (12 a 16cm)	4 (57%)	5 (89%)
	5- Muito longo (>16cm)	5 (41%)	

LLF	4- Longo (12 a 16cm)	4 (16%)	4 (1%)
	5- Muito longo (>16cm)	5 (84%)	5 (99%)
PSL	1- Ausente	1 (3%)	1 (4%)
	4- Profunda	4 (97%)	4 (96%)
FOF	1- Lanceolada	1 (3%)	1 (4%)
	6- Fendida	8 (97%)	6 (1%)
	8- Seccionada		8 (95%)
DLF	1- Inteira	1 (1%)	1 (4%)
	3- Trilobada	3 (71%)	3 (96%)
	4- Pentalobada	4 (28%)	
PHE	1- Ausente	2 (100%)	1 (60%)
	2- Presente		2 (40%)
COF	1- Verde-clara	1 (14%)	1 (4%)
	2- Verde	2 (77%)	2 (62%)
	3- Verde-escura	3 (9%)	3 (34%)
FBF	1- Arredondada	1 (3%)	1 (1%)
	3- Atenuada	3 (8%)	3 (9%)
	7- Digitiforme	7 (89%)	7 (90%)
FAF	1- Arredondado	1 (8%)	1 (9%)
	2- Atenuado	2 (11%)	2 (6%)
	4- Acuminado	4 (81%)	4 (85%)
NNE	1- Ausente (0)	1 (11%)	1 (2%)
	2- Pouco (1-2)	2 (13%)	2 (4%)
	3- Mediano (>2-4)	3 (76%)	3 (92%)
	4- Elevado (>4)		4 (2%)
PON	1- Ausente	1 (11%)	1 (1%)
	2- Basilaminar	4 (89%)	2 (2%)
	4- Marginal		4 (97%)
CPL	3- Médio (>3 a 4cm)	3 (24%)	4 (100%)
	4- Longo (>4cm)	4 (76%)	
NNP	2- Pouco (1-2)		2 (94%)
	3- Mediano (>2-4)	2 (100%)	3 (3%)
	4- Elevado (>4)		4 (3%)
PNP	2- Adjacente ao limbo foliar		2 (4%)
	4- Adjacente à inserção da folha no ramo	4 (100%)	4 (96%)

Tabela 4. Valores médio, mínimo e máximo (mm) dos descritores quantitativos dos caracteres morfoagronômicos da haste e folhas das plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*.

<i>P. cincinnata</i>	Descritores					
	DIH	CLF	LLF	NNE	CPL	NNP
Diploide	7,62 (6,6-8,5)	155,39 (116,1-188,2)	176,77 (124,3-227,1)	3,21 (0-4)	44,56 (35,7-57,8)	1,95 (1-2)
Triploide	8,46 (8,0-9,1)	172,49 (147,9-213,0)	199,50 (146,9-278,7)	3,71 (0-6)	50,95 (42,7-69,5)	2,12 (2-5)

DIH= Diâmetro da haste; CLF= Comprimento do limbo foliar; LLF= Largura do limbo foliar; NNE= Número de nectários no limbo foliar; CPL= Comprimento do pecíolo; NNP= Número de nectários no pecíolo.



Figura 4. Dimorfismo foliar em *P. cincinnata*. (A) Folhas coletadas no terço médio de plantas obtidas a partir da germinação de sementes. Bar.11mm; (B) Folhas coletadas no terço médio de plantas regeneradas a partir do endosperma. Bar. 12mm.

O florescimento das plantas diploides e triploides ocorreram aos 210 dias após a transferência para os vasos em casa de vegetação. Da produção dos botões florais até a antese foram necessários entre 22 a 26 dias para as plantas diploides e de 17 a 21 dias para as triploides. A antese das flores diploides ocorreu aproximadamente as 05:20 horas da manhã e fecham as 20:00 horas. Já nas triploides, ocorreu a antese as 05:00 horas da manhã e o fechamento das flores às 20:30 horas.

As flores das plantas diploides apresentaram colorações mais suaves (Tabela 5), com cores variando de rosa purpuro, lilás à roxa (Figura 5A-E). O hipanto é campanulado, com diâmetro médio de 7,62 mm, com três brácteas, cinco sépalas e pétalas (Figura 6A), com comprimento médio de 31,93, 41,86 e 40,54 mm e largura média de 17,17, 15,08 e 9,4 mm, respectivamente (Tabela 6). A coloração do perianto, região interna que abrange as pétalas e sépalas, variou de branco a azul-roxeadado (Figura 5A-E). O diâmetro foi de 84,7 a 120,1 mm para a coroa e seus filamentos são ondulados com coloração predominante na cor rosa, com 3,03 anéis coloridos e comprimento

médio de 19,09 mm (Tabela 6). O opérculo é de cor branca com rosa e a cavidade da corona tem diâmetro externo e interno de 98,29 e 4,69 mm, respectivamente (Figura 6F). Na cavidade da corona foi extraído o néctar para análise da concentração de brix, no qual apresentou valor médio de 30,91% (Figura 5).

As flores possuem cinco anteras (Figura 6D), em comprimento médio de 12,05 mm e largura de 5,36 mm. Algumas anteras apresentaram em seu dorso ausência de antocianina e outras variaram de poucos a muitos pontos (Figura 6D). Da mesma forma, seus filetes continham ausência ou presença de antocianina, variando de poucos a muitos pontos, com comprimento médio de 11,20 mm. Com comprimento médio de 18,94 mm, o estilete apresentou três estigmas com poucos pontos de antocianina. O androginóforo exibiu comprimento de 10,46 mm, com poucos pontos de antocianina (Figura 6F), e, logo acima, o ovário teve comprimento mediano, com 6,58 mm e largura de 5,10 mm.

As plantas triploides produziram flores com tonalidades mais intensas, com sete variedades de flores, desde roxas-escuras ao rosa-púrpura (Figura 8A-G). O diâmetro do hipanto variou de 8,0 a 9,1 mm, de formato campanulado. As flores são formadas de três brácteas com largura média de 20,12 e comprimento de 37,93 mm, com número alto de nectários, média de 20,3 (Tabela 6). Sépalas e pétalas são cinco e com grande quantidade de antocianina, predominando as de coloração roxa-escura (Figura 5B), com comprimento médio de 49,16 e 45,13 mm e largura média de 17,39 e 12,45 mm, respectivamente. As séries internas ou perianto, apresentam coloração roxa a azul-arroxeadas (Figura 8A-G). Os filamentos da corona são ondulados, com média de 3,62 anéis distribuídos ao longo de 22,79 mm de comprimento com coloração roxa. O diâmetro da corona variou de 104,2 a 142,1 mm (Tabela 6).

A cavidade interna e externa apresentou diâmetro de 5,59 e 15,88 mm e o opérculo é de cor branca com rosa, branca com roxa e roxa. A concentração de brix do néctar extraído do botão floral foi de 39,26% (Figura 8). As anteras, em número de cinco, apresentaram em seu dorso ausência de antocianina e outras variaram de poucos a muitos pontos (Figura 6E), com comprimento médio foi de 13,87 e largura de 5,75 mm, e filetes com comprimento médio de 12,68 mm, com ausência ou presença de antocianina, variando de poucos a muitos pontos. Os três estigmas, em sua maioria, apresentaram hercogamia ou deflexão, estando próximos ou na linha das anteras, ou

ainda, acima da linha das anteras (Figura 6C). O conjunto com o estilete apresentou 21,61 mm com vários pontos de antocianina (Figura 7E). O androginóforo possui comprimento de 12,67 mm, com vários pontos de antocianina. O comprimento do ovário foi de médio a longo com 8,29 mm e largura de 5,75 mm.

Tabela 5. Descritores e frequência da classe fenotípica (categoria) avaliados em 10 plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*.

Descritores da flor	Categoria	Frequência (%) Diploide	Frequência (%) Triploide
COB	2- Médio (2 a 4 cm)	2 (100%)	2 (90%)
	3- Longo (>4 cm)		3 (10%)
LAB	1- Curto (<2 cm)	1 (93,67%)	1 (37,33%)
	2- Médio (2 a 4 cm)	2 (6,33%)	2 (62,67%)
NUB	2 – Três	2 (100%)	2 (100%)
NNB	4- Elevado (>4)	4 (100%)	4 (100%)
COS	2- Médio (3-6cm)	2 (100%)	2 (99%)
	3- Longo (>6cm)		3 (1%)
LAS	2- Média (1 a 2 cm)	2 (100%)	2 (97,8%)
	3- Larga (> 2 cm)		3 (2,2%)
NUS	3- Cinco	5	5
NNS	3- Mediano (2-4)	3 (40%)	3 (10%)
	4- Elevado (>4)	4 (60%)	4 (90%)
COA	2- Curto (0,5–1cm)	2 (34%)	2 (1%)
	3- Médio (>1-2cm)	3 (66%)	3 (99%)
	3- Médio (>6 – 9 cm)	3 (22%)	
DEA	4- Grande (>9 – 12 cm)	4 (77%)	4 (34%)
	5- Muito grande (>12 cm)	5 (1%)	5 (66%)
BFC	2- Presente	2 (100%)	2 (100%)
	1- Ausente		
NAC	2- Um	2 (2%)	
	3- Mais de um	3 (98%)	3 (100%)
CAC	2- Rosa	2 (70%)	2 (10%)
	3- Roxa	3 (30%)	3 (90%)
CFC	3- Média (1–1,5cm)	3 (11%)	
	4- Larga (>1,5cm)	5 (89%)	5 (100%)
COP	2- Médio (2-4 cm)	2 (44%)	2 (3%)
	3- Longo (>4 cm)	3 (56%)	3 (97%)
LAA	2- Média (0,5–1cm)	2 (28,8%)	2 (2,8%)
	3- Larga (>1cm)	3 (71,2%)	3 (96,2%)
NUP	3- Cinco	5	5
	3- Branca + rosa	3 (70%)	3 (15%)
CFE	4- Branca + roxa	4 (25%)	4 (50%)
	5- Roxa	5 (5%)	5 (35%)
FLC	2- Ondulados	2 (100%)	2 (100%)
PPA	1- Matutino	1 (100%)	1 (100%)
	1- Branca		
CPP	5- Roxa	1 (20%)	1 (10%)
	6- Azul-arroxeadada	6 (70%)	5 (70%)
	8- Outro	8 (10%)	6 (20%)
CPO	1- Curto (<2cm)	1 (10%)	1 (2%)
	2- Médio (2-4cm)	2 (78%)	2 (62%)
	3- Longo (>4cm)	3 (12%)	3 (36%)
CAA	2- Médio (0,5-1cm)	2 (3,6%)	
	3- Longo (>1cm)	3 (96,4%)	3 (100%)

LGA	3- Larga (>3mm)	3 (100%)	3 (100%)
NAN	3- Cinco	3 (100%)	3 (100%)
	1- Ausente	1 (13%)	1 (3%)
PAA	2- Poucos pontos	2 (36%)	2 (21%)
	3- Muitos pontos	3 (51%)	3 (76%)
COV	2- Médio (4–8mm)	2 (95%)	2 (44%)
	3- Longo (>8mm)	3 (5%)	3 (56%)
DIO	2- Média (1,5-3mm)	2 (80%)	2 (10%)
	3- Larga (>3mm)	3 (20%)	3 (90%)
	1- Ausente	1 (12%)	1 (3%)
PAF	2- Poucos pontos	2 (68%)	2 (23%)
	3- Muitos pontos	3 (20%)	3 (74%)
	1- Ausente	1 (11%)	1 (3%)
PAE	2- Poucos pontos	2 (72%)	2 (23%)
	3- Muitos pontos	3 (17%)	3 (74%)
	1- Ausente	1 (13%)	1 (3%)
PAA	2- Poucos pontos	2 (64%)	2 (25%)
	3- Muitos pontos	3 (23%)	3 (72%)
NUE	2- Três	2 (100%)	2 (100%)



Figura 5. Flores diploides de plantas obtidas através da germinação de sementes de *P. cincinnata* cultivadas em casa de vegetação. A-E: Diversidade de coloração e formato das flores das plantas diploides de *P. cincinnata*. A= Bar. 11mm; B= 7mm; C= 7mm; D=7mm; D= 7mm.

Tabela 6. Valores médio, mínimo e máximo (mm) dos descritores quantitativos dos caracteres morfoagronômicos das flores das plantas diploides e triploides de *P. cinnnata*.

<i>P. cinnnata</i>	Descritores			
	DAH	COB	LAB	NNB
Diploide	14,55 (11,8-16,3)	31,93 (27,3-37,7)	17,17 (13,5-22,1)	14,2 (10-24)
Triploide	18,01 (13,3-20,2)	37,93 (27,0-41,5)	20,12 (14,3-23,1)	20,3 (15-27)
Descritores				
<i>P. cinnnata</i>	COS	LAS	NNS	COA
Diploide	41,86 (30,0-50,5)	15,08 (11,6-18,3)	5,6 (2-12)	10,46 (7,9-13,5)
Triploide	49,16 (39,3-60,9)	17,39 (11,8-22,0)	9,3 (4-14)	12,67 (9,9-14,9)
Descritores				
<i>P. cinnnata</i>	DEA	NAC	CFC	DEC
Diploide	98,29 (84,7-120,1)	3,03 (1-4)	19,09 (11,8-23,2)	14,17 (11,6-16,4)
Triploide	119,15 (104,20-142,1)	3,62 (2-5)	22,79 (19,4-26,1)	15,88 (12,8-19,2)
Descritores				
<i>P. cinnnata</i>	DIC	COP	LAA	CPO
Diploide	4,69 (3,4-6,1)	40,54 (30,0-49,5)	9,4 (5,6-13,5)	30,23 (11,3-47,1)
Triploide	5,59 (3,7-6,5)	45,13 (37,9-49,5)	12,45 (9,59-15,6)	36,33 (18,7-48,6)
Descritores				
<i>P. cinnnata</i>	CAA	LGA	COV	DIO
Diploide	12,05 (8,2-14,7)	5,36 (3,9-6,9)	6,58 (4,96-8,7)	5,10 (3,3-5,9)
Triploide	13,87	5,75 (3,4-7,7)	8,29 (5,8-11,5)	5,93 (4,3-7,4)
Descritores				
<i>P. cinnnata</i>	CFI	CES	CBB	
Diploide	11,20 (8,0-13,6)	18,94 (14,4-22,1)	30,91 (21,0-41,5)	
Triploide	12,68 (10,7-17,1)	21,61 (18,9-24,6)	39,26 (32,0-49,0)	

DAH= Diâmetro do hipanto; COB= Comprimento da bráctea; LAB= Largura da bráctea; NNB= Número de nectário na bráctea; COS= Comprimento da sépala; LAS= Largura da sépala; NNS= Número de nectários na sépala; COA= Comprimento do androginóforo; DEA= Diâmetro da extremidade da corona; NAC= Número de anéis coloridos nos filamentos da corona; CFC= Comprimento dos anéis do filamento da corona; DEC= Diâmetro externo da cavidade da corona; DIC= Diâmetro interno da cavidade da corona; COP= Comprimento da pétala; LAA= Largura da pétala; CPO= Comprimento do pedúnculo; CAA= Comprimento da antera; LGA= Largura da antera; COV= Comprimento do ovário; DIO= Diâmetro do ovário; CFI= Comprimento do filete; CES= Comprimento do estilete; CBB= Concentração de brix botão floral.

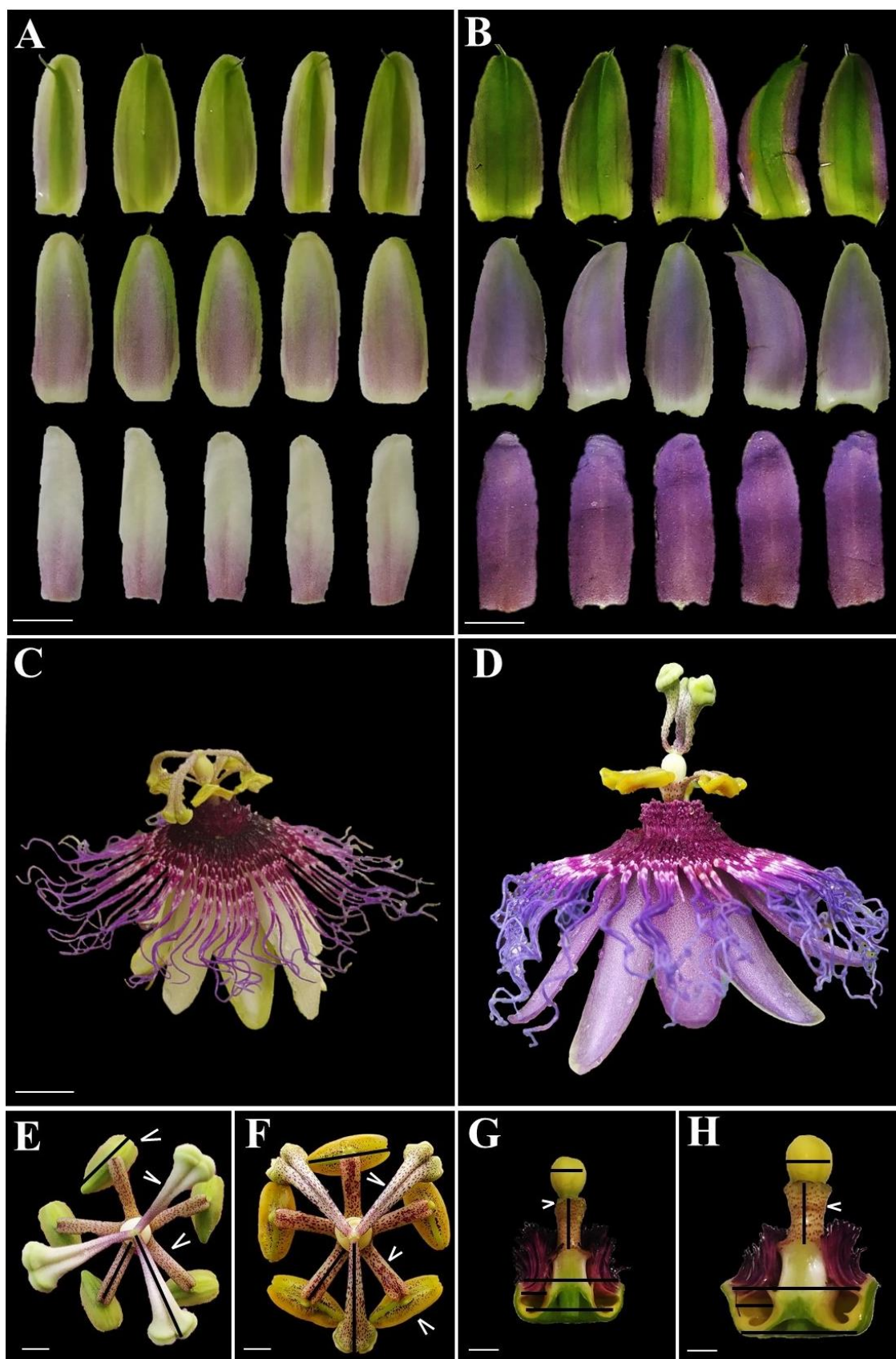


Figura 6. Plantas triploides cultivadas em casa de vegetação regeneradas a partir do tecido endosperma de *P. cincinnata* e plantas germinadas a partir de sementes como controle. A) Sépalas da flor diploide, sépalas da flor diploide e pétalas da flor diploide. Bar. 10mm; B) Sépalas da flor triploide, sépalas da flor triploide, pétalas da flor triploide. Bar. 11mm; C) Flor

diploide. Bar. 11mm; D) Flor triploide. Bar. 13mm; E) Ausência de antocianina no dorso da antera flor diploide, comprimento da antera flor diploide, poucos pontos de antocianina no filete da flor diploide, comprimento do filete flor diploide, poucos pontos de antocianina estilete flor diploide, comprimento estilete flor diploide. Bar. 5mm; F) Pontos de antocianina no dorso da antera flor triploide, comprimento da antera flor triploide, vários pontos de antocianina filete da flor triploide, comprimento do filete flor triploide, vários pontos de antocianina estilete flor triploide e comprimento estilete flor triploide. Bar. 5mm; G) Diâmetro ovário flor diploide, pontos de antocianina, comprimento do androginóforo flor diploide, diâmetro externo e interno da cavidade da corona flor diploide e diâmetro do hipanto flor diploide. Bar. 6mm; H) Diâmetro do ovário flor triploide, pontos de antocianina e comprimento do androginóforo flor triploide, diâmetro externo e interno da cavidade da corona flor triploide e diâmetro do hipanto flor triploide. Bar 5mm.

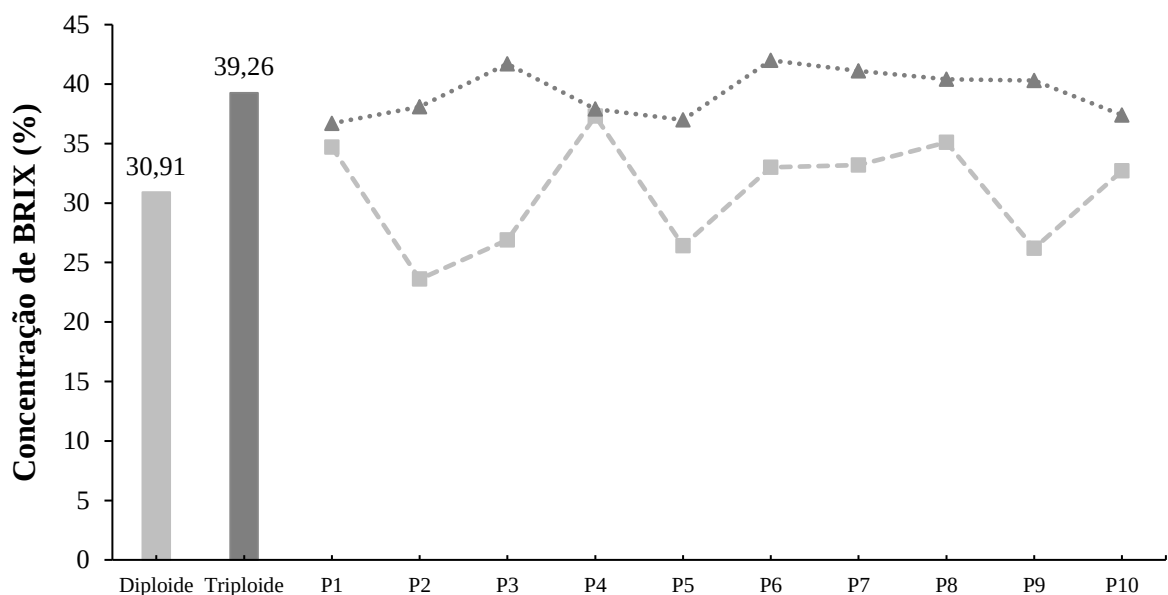


Figura 7. Porcentagem média da concentração de brix do botão floral de plantas diploides e triploides de *P. cincinnata* e os valores mínimo e máximo nas 10 plantas avaliadas.



Figura 7. Flores das plantas triploides de origem a partir do cultivo in vitro do tecido endospermico pela via embriogênica de *P. cincinnata*, cultivadas em casa de vegetação. A-G: Diversidade de coloração e formas das flores das plantas triploides de *P. cincinnata*. A) Bar. 12mm; B) Bar. 6mm; C) Bar. 6mm; D) Bar. 6mm; E) Bar. 6mm; F) Bar. 6mm; G) Bar. 6mm.

3.3 Viabilidade polínica

A viabilidade polínica das plantas diploides foi de 98,21%, da análise de 1.062 pólenes, ou seja, do total quantificado 1043 foram viáveis e 19 inviáveis (Figura 10F). As triploides tiveram a mesma performance, tendo 97,82% de viabilidade polínica, na quantificação de 1057 grãos de pólen, onde 1034 foram viáveis e 23 inviáveis (Figura 10F). Os grãos de pólen das plantas diploides apresentaram menor tamanho (Figura 10A-B) em comparação as plantas triploides de *P. cincinnata*, que exibiram maiores variações no tamanho, formato e intensidade de fluorescência, sugerindo que os grãos de pólen das plantas triploides apresentam maiores conteúdos de DNA. Os grãos de pólen viáveis são maiores, com a coloração fluorescente mais intensificada e com

formas variáveis (Figura 10C). A inviabilidade polínica foi observada nos grãos de pólen menores e opacos conforme observado na Figura 10D. As plantas triploides apresentaram grãos de pólen com formatos alterados e irregulares (achatado), conforme exemplificado na figura 10E.

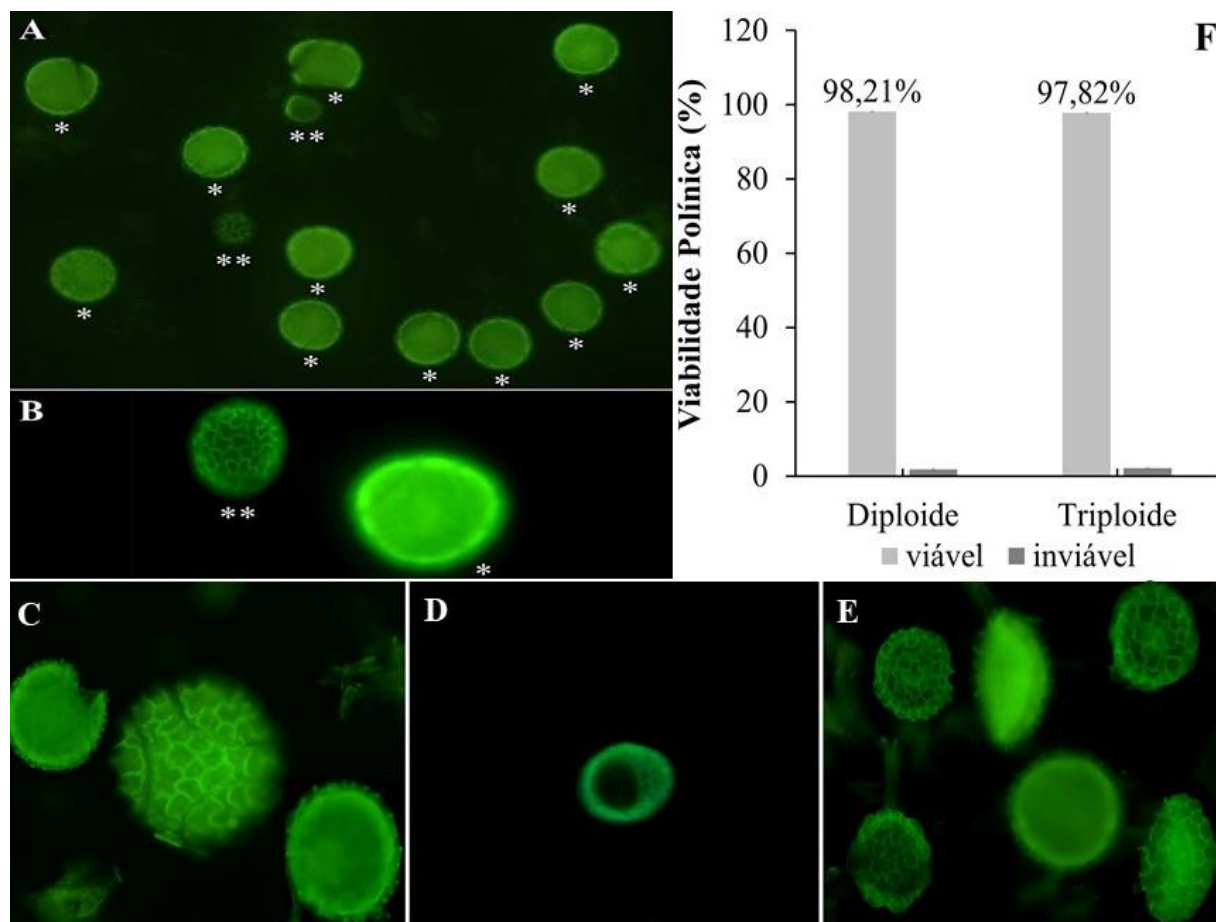


Figura 10. Análise da viabilidade polínica de plantas diploides e triploides de *P. cinnamomum* regeneradas a partir do cultivo in vitro do endosperma. A) Grãos de pólen viáveis e inviáveis de plantas diploides (*Viáveis; **Inviáveis); B) Pólen de plantas diploides em destaque (*Viável; **Inviável); C) Grãos de pólen de planta triploide com dimensão maior; D) Grão de pólen inviável de plantas triploides; E) Grãos de pólen de plantas triploides em dimensões variáveis; F) Viabilidade polínica de pólen diploides e triploides.

4. DISCUSSÃO

O sistema de regeneração de endosperma a partir da embriogênese somática para produção de plantas triploides foi estabelecido para *P. cinnamomum*. Neste trabalho, reproduzindo o protocolo responsivo de embriogênese somática de Silva et al. (2009), foi possível a obtenção de plantas triploides completas e estáveis a partir do tecido endospermico de *P. cinnamomum*, devido ao excelente desempenho in vitro com elevada

frequência de formação de regenerantes dessa espécie e o equilíbrio de auxina/citocinina (18,1 μM de 2,4-D + 4,5 μM de BA), demonstrando que o 2,4-D + BA ativam genes responsáveis pela aquisição da competência celular, determinação e diferenciação de células embriogênicas em embriões somáticos (Otoni et al., 2013; Rocha et al., 2015)

Antoniuzzi et al. (2018) e Faria et al. (2018) relataram com sucesso a capacidade de expressão de genes de pluripotência e a alta expressividade desses genes em células meristemáticas do tecido endospermico de *P. edulis* e *P. cristalina*, respectivamente. Silva et al. (2009) e Otoni et al. (2013) já consideravam a espécie *P. cincinnata* como referência do gênero na embriogênese somática, por exibir alta responsividade ao cultivo in vitro e expressiva resposta embriogênica. Paim Pinto et al. (2011) relataram baixo grau de instabilidade cromossômica.

O tecido endospermico é considerado uma fonte importante de explante para a regeneração direta de plantas triploides e a via embriogênica foi utilizado com sucesso para um reduzido número de plantas frutíferas como *Citrus nobilis* Lour. (Kosmiatin et al., 2014), *Mangifera indica* L. (Hindaningrum et al., 2014) e *Persea americana* (Sukmara et al., 2014), devido à dificuldade de estabelecimento de protocolos responsivos de embriogênese somática em diversas espécies. As plantas triploides de *P. cincinnata* originadas a partir do tecido endospermico pela via embriogênica cultivadas in vitro tiveram a estabilidade genética confirmadas através da citometria de fluxo e da análise cromossômica as quais apresentaram conteúdo de DNA nuclear de 4,38pg e a diploide 2,98pg, com número cromossômico de $2n=27$ e $2n=18$, respectivamente. Antoniuzzi et al. (2018) regenerando in vitro plantas triploides de *P. edulis* com o uso do tecido endospermico também observaram a estabilidade genética com $2n=18$ para as plantas diploides e $2n=27$ cromossomos para as plantas triploides.

O fenômeno da alteração estrutural e funcional do genoma causada pela triploidia é reconhecido como uma fonte de diversidade genética (Serapiglia et al. 2014; Spoelhof et al., 2017). A análise da frequência fenotípica indicou a existência de variabilidade genética intraespecífica entre plantas da mesma ploidia (diploide x diploide; triploide x triploide) e interespecífica entre as plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*, como descrito na Tabelas 3 e 5. Isso demonstra que *P. cincinnata* apresenta expressiva variabilidade para vários caracteres de interesse agrônomico e que o nível de ploidia

influenciou no aumento da variabilidade genética das classes fenotípicas avaliadas. Por exemplo, a variedade de folhas e flores distinguiu dentro das plantas diploides e triploides e entre as plantas diploides e triploides, evidenciando a variabilidade na expressão fenotípica, ocasionada pela variabilidade genética de plantas oriundas de sementes e de plantas triploides regeneradas do tecido endospermico, promovendo o aumento de polimorfismo desses genótipos.

A maioria dos descritores (79%) apresentaram polimorfismo, ou seja, ocorreu variação fenotípica que pôde ser separada em classes distintas e bem definidas. Apenas os descritores formato da haste, presença de heterofilia, número de brácteas, número de nectários na bráctea, número de sépalas, bandeamento nos filamentos mais longos da coroa, número de pétalas, filamento mais longo da coroa, período predominante da antese, largura da antera, número de anteras e número de estigmas não diferenciaram-se entre as plantas e os níveis de ploidia.

O baixo percentual de monomorfismo (21%) é indicativo da alta variabilidade genética inter e intraespecíficas das plantas analisadas. Segundo Nobrega et al. (2017) e Fonseca et al. (2017), *P. cincinnata* é uma espécie polimorfa, apresentando variabilidade quanto ao tamanho do fruto, cor da flor e heterofilia das folhas. Paiva et al. (2014) e Oliveira et al. (2018) verificaram alta variabilidade genética em nível inter e intraespecífica nas espécies de *Passiflora*. Alta variabilidade genética intraespecífica foram observados por Araújo et. al. (2008) e seus colaboradores em acessos da espécie silvestre de *P. cincinnata*.

Diferenças significativas foram observadas para todas as características morfológicas avaliadas entre plantas triploides e diploides. Comparadas aos diploides, as plantas triploides apresentaram folhas com maior comprimento ($213,0 \pm 172,49\text{mm}$) e largura ($278,7 \pm 199,50\text{mm}$), flores maiores ($142,1 \pm 119,15\text{mm}$), maior diâmetro do ovário ($7,4 \pm 5,93\text{mm}$) e da cavidade interna da coroa ($6,5 \pm 5,59\text{mm}$).

Essa superioridade das plantas triploides pode ser explicado devido ao efeito imediato do aumento de ploidia, que provoca mudanças na expressão gênica (Simon-Porcar et al., 2017; Liqin et al., 2019; Du et al., 2020), alterando as formas fenotípicas dos triploides (Padoan et al. 2013; Tikun et al., 2014), tornando-os capazes de ser visivelmente diferentes dos diploides (Alam et al., 2015; Sattler et al., 2016). Além

disso, tem ficado claro que essas modificações fenotípicas observadas nas plantas triploides influenciam no incremento dos órgãos vegetativos (efeito “gigas”), proporcionando maior altura, área foliar, comprimento médio do pecíolo, folhas e flores (Liao et al., 2016; Nakel et al., 2017; Liqin et al., 2019; Du et al., 2020).

As folhas das plantas triploides também apresentaram variabilidade genética, exibindo formas inteiras e trilobadas, enquanto que nas diploides ocorreu predominância de folhas pentalobadas, com pequena frequência de folhas trilobadas. Araújo (2007), identificou variações na morfologia foliar entre acessos diploides de *P. cincinnata*, com plantas de folhas simples ou inteiras, trilobadas e pentalobadas, entretanto, observamos que as plantas triploides de *P. cincinnata* apresentaram maior diversificação na morfologia foliar (Figura 4B). Observações semelhantes foram relatadas por Liqin et al. (2019), onde as plantas triploides de *Populus* apresentaram variações na morfologia foliar em relação aos seus parentais diploides e aos tetraploides.

Os triploides de *P. cincinnata* exibiram 7 (sete) variações nos tipos de flores, com predominância de coloração roxa, corona com coloração azul arroxeadada e formato ondulado dos filamentos. A adição de ploidia em plantas de *P. cincinnata* provocou alterações na expressão dos genes e induziu a ocorrência de colorações fenotipicamente variadas das flores. A diversidade florística encontrada nas plantas triploides demonstra que essa espécie possui atributos ornamentais e que o sistema de regeneração de plantas triploides pelo endosperma é interessante para aumentar a diversidade de flores e a produção de plantas estáveis. A indução de poliploidia em espécie de orquídea proporcionou flores maiores, com coloração variada e maior tempo de duração (Vichiato et al., 2014).

Segundo Manzoor et al. (2019), a poliploidia é importante para o desenvolvimento de novas variedades ornamentais, com folhas e flores de colorações mais intensas e maior espessura, pétalas mais grossas e maior durabilidade de floração. Mikovski et al., (2019) e Rocha et al. (2020) em suas revisões sobre o gênero *Passiflora* destacam o caráter ornamental das espécies desse gênero e indicam a cultura de tecidos como uma importante ferramenta para a produção de plantas ornamentais em larga escala.

Os botões florais das plantas triploides de *P. cincinnata* apresentaram valores significativamente maiores ($49,0 \pm 39,26$) de brix que os seus respectivos diploides ($41,4 \pm 30,91$). Melancias triploides (Kawamura et al., 2018) e uvas triploides (Jediyi et al., 2019) também apresentaram, similarmente, valores maiores de sólidos solúveis totais frente a seus diploides. Maiores valores de Brix encontrados nas plantas triploides de *P. cincinnata* explicam o fato de porque essas plantas exibiram maior diâmetro interno da cavidade da corona, pois, de acordo com Rodriguez-Peña et al. (2016) e Rangel Junior et al. (2018), a maior concentração de açúcar provavelmente está relacionada a uma maior quantidade de volume, resultando em uma câmara nectarífera maior.

A espécie *P. cincinnata* é auto incompatível e depende de polinizadores do gênero *Xylocopa* para a produção de frutos (Kiill et al., 2010). Por apresentar oferta de néctar em quantidades superiores às plantas diploides e também maior período de abertura das flores, essas plantas triploides surgem como estratégias para aumentar a atratividade de polinizadores e melhorar a eficiência da polinização natural, influenciando diretamente no aumento da produtividade, ao ser plantadas nas bordas dos cultivos comerciais de *Passiflora*.

O maracujá apresenta grande variabilidade genética de espécies e variedades que podem ser utilizadas em programas de melhoramento de porta enxertos e diversificar a produção com novas cultivares e desenvolver novas plantas ornamentais e medicinais (Zeraik et al., 2010; Meletti, 2011; Faleiro et al., 2015; Cerqueira-Silva et al., 2016; Sozo et al., 2016; Bruckner et al., 2018). As plantas triploides de *P. cincinnata* apresentaram maior diâmetro de hastes que os diploides. O diâmetro das hastes é uma das características determinantes para que uma espécie de maracujazeiro seja recomendada como porta-enxerto e em hastes de menor diâmetro proporciona baixo vigor vegetativo ao longo do ciclo, reduzindo a produtividade (Cavichioli et al., 2017).

A cópia extra de cromossomos e seus impactos na planta triploide de *P. cincinnata*, de fato concedeu incremento aos tamanhos dos órgãos vegetativos. A triploidia aumentou significativamente a diversidade morfológica das folhas e flores, com proporções fundamentalmente uteis para a produção de plantas ornamentais.

Os resultados da caracterização morfoagronômica das plantas triploides de *P. cincinnata* só foi possível devido a responsividade do tecido endospermico na produção de embriões somáticos e plantas completas. A cultura do endosperma demonstrou ser um método direto para regeneração de plântulas triploides dessa espécie em apenas 90 dias. Assim, pela primeira vez é relatado dados morfológicos quantitativos e qualitativos de plantas triploides regeneradas do tecido endospermico pela via embriogênica no gênero *Passiflora*, abrindo novas perspectivas de aplicação desse estudo em outras espécies, tornando-se uma eficiente ferramenta para o melhoramento genético do gênero.

5. CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção de plantas triploides através da regeneração do tecido endospermico de *P. cincinnata* por meio da embriogênese somática. O sistema de regeneração comprovou ser eficiente para produção de plantas triploides geneticamente estáveis com $2n = 3x = 27$ cromossomos, através da citometria de fluxo.

As plantas triploides mostraram-se superiores nas características vegetativas e nos atributos florais e foliares. A planta apresenta folhas grandes e perenes, flores de maior tamanho e coloridas com longo período de florescimento. As folhas e flores são consideradas atrativos do ponto de vista ornamental. Novos conhecimentos na obtenção de triploidia através de sistema responsivo de regeneração in vitro abrem novas perspectivas para o melhoramento de espécies de maracujazeiros para o mercado de plantas ornamentais e frutíferas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, H.; RAZAQ, M.; SALAHUDDIN. Induced Polyploidy as a Tool for Increasing Tea (*Camellia sinensis* L.) Production. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.22, p.43-47, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(16\)30005-8](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(16)30005-8)

ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C.; TIRADENTES, A. T.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.329-332, 2013.

ANTONIAZZI, C. A.; FARIA, R. B.; CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; MATOS, E. M.; OTONI, W. C. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. v.238, p.408-415, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.001>

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.723-730, 2008.

ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. **Scientia Horticulturae**. v.219, p.53-59, 2017.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.045>

BASUMATARI, M.; DAS, B. N. Karyomorphological studies in two species of *Bauhinia* Linn. and induction of polyploidy in *Bauhinia acuminata* Linn. **International Journal of Life Sciences Research**, v.3, p.123-1229, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.4.20>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de cultivares. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de maracujá (*Passiflora* L. e híbridos específicos) exceto *Passiflora edulis* Sims**. 2016.

BRUCKNER, C. H.; SANTOS, C. E. M.; MELETTI, L. M. M.; OTONI, W. C. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H.; SANTOS, C. E. M. (eds). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: Editora UFV, 2018, p.246–318.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. **Heredity**, v.70, p.515–519, 1993.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.) In: AHUJA, M. R.; JAIN, S. M. (eds). **Genetic Diversity and Erosion in Plants – Case Histories**. Vol. 2. Dordrecht, Springer International Publishing, 2010. p.215–231.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture. **Plant Cell Reports**, v.21, p.531-537, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0565-6>

CAVICHIOLO, J. C.; NOBUYOSHI, N.; NASSER, M. D.; TAKATA, W. H. S. Desenvolvimento e produtividade de maracujazeiro amarelo Enxertado na região de Presidente Prudente, SP. **Cultura Agronômica**, v.26, p.61-68, 2017.

COHEN, H.; FAIT, A.; TEL-ZUR. Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species. **BMC Plant Biology**, v.13, p.1-14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-173>

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**. v.6, p.836-846, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg1711>

CZARNECKI, D. M.; HERSHBERGER, A. J.; ROBACKER, C. D.; CLARK, D. G.; DENG, Z. Ploidy Levels and Pollen Stainability of *Lantana camara* Cultivars and Breeding Lines. **Horticultural Science**, v.49, p.1271-1276, 2014. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.10.1271>

DOLEZEL J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**, v.95, p.99–110, 2005.

DU, K.; LIAO, T.; REN, Y.; GENG, X.; KANG, X. Molecular mechanism of vegetative growth advantage in allotriploid *Populus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.441, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21020441>

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.54, p.166-174, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9881-y>

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BARTH, M.; FELBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, p.849-860, 2017.

GARG, L.; BHANDARI, N. N.; RANI, V.; BHOJWANI, S. S. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.855–858, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00233156>

GMITTER, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 785-790, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224192>

GÓRALSKI, G.; POPIELARSKA, M.; SLESIAK, H.; SIWINSKA, D.; BATYCKA, M. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured in vitro. **Acta Biologica cracoviensia: Series Botanica**, v.47, p.121-128, 2005.

HOJSGAARD, D. transient activation of apomixis in sexual neotriploids may retain genomically altered states and enhance polyploid establishment. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00230>

HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.1-8, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.041>

KAWAMURA, S.; IDA, K.; OSAWA, M.; IKEDA, T. No effect of seed presence or absence on sugar content and water status of seeded and seedless watermelon fruits. **Horticultural Science**, v.53, p.304-312, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12707-17>

KIN, M. S.; FRASER, L. G.; HARVEY, C. F. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, v.44, p.107-117, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90021-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90021-6)

KIKUCHI, S.; IWASUNA, M.; KOBORI, A.; TSUTAKI, Y.; YOSHIDA, A.; MUROTA, Y.; NISHINO, E.; SASSA, H.; KOBAYASHI, T. Seed formation in triploid loquat (*Eriobotrya japonica*) through cross-hybridization with pollen of diploid cultivars. **Breeding Science**, v.64, p.176-182, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.176>

HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v.45, p.115-120, 1970.

HINDANINGRUM, I. F.; WIENDI, N. M. A.; WIDODO, W. D. Pembentukan embrio endospermik sekunder mangga (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Klon 289. **Jurnal Agronomi Indonesia**, v.42, p.150-157, 2014.

JEDIYI, H.; NAAMANI, K.; ELKOCH, A. A.; DIHAZI, A.; FELS, A. E. A. E.; ARKIZE, W. First study on technological maturity and phenols composition during the ripeness of five *Vitis vinifera* L grape varieties in Morocco. **Scientia Horticulturae**, v.246, p.390-397, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.052>

JESUS, F. N.; MACHADO, C. F.; SOUZA, V. O.; MATOS, M. S. S.; SILVA, J. S.; LEDO, C. A. S.; FALEIRO, F. G. **Caracterização morfoagronômica de acessos da coleção de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 27p. 2014.

KHILL, L. H. P.; SIQUEIRA, K. M. M.; ARAÚJO, F. P.; TRIGO, S. P. M.; FEITOZA, E. A.; LEMOS, I. B. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* mast. (*Passifloraceae*) na região de Petrolina (Pernambuco, Brazil). **Oecologia Australis**, v.14, p.115-127, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.05>

KOSMIATIN, M.; PURWITO, A.; WATTIMENA, G. A.; MARISKA, I. Induksi Embriogenesis Somatik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. **Jurnal Agronomi Indonesia**, v.42, p.44-51, 2014.

KOSMIATIN, M.; HUSNI, A. Perakitan varietas tanpa jeruk biji melalui pemuliaan konvensional dan nonkonvensional. **Jurnal Litbang Pertanian**, v. 37, p. 91-100, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21082/jp3.v37n2.2018.p91-100>

LIAO, T.; CHENG, S.; ZHU, X.; MIN, Y.; KANG, X. Effects of triploid status on growth, photosynthesis, and leaf area in *Populus*. **Trees**, v.30, p.1137–1147, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1352-2>

LIQIN, G.; JIANGUO, Z.; XIAOXIA, L.; GUODONG, R. Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. **Molecular Breeding**, v.39, p.69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0975-6>

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. **Annals of Botany**, v.100, p.875–888, 2007.

MANZOOR, A.; AHMAD, T.; BASHIR, M. A.; HAFIZ, I. A.; SILVESTRI, C. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. **Plants (Basel)**, v.7, p.194, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8070194>

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; AZEVEDO FILHO, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.17, p.87-95, 2011.

MIKOVSKI, A. I.; SILVA, N. T.; SOUZA, C. S.; MACHADO, M. D.; OTONI, W. C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**, v.25, p.189-199, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v25i2.2036>

MIYASHITA, T.; OHASHI, T.; SHIBATA, F.; ARAKI, H.; HOSHINO, Y. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, p.291-301, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9562-6>

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.161-164, 1996.

MUÑOZ-CONCHA, D. Culture of triploid tissue from the endosperm of an endangered Chilean tree species *Gomortega keule*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.91, p.79-86, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.1110995>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAKEL, T.; TEKLEYOHANS, D. G.; MAO, Y.; FUCHERT, G.; VO, D.; GROß-HARDT, R. Triparental plants provide direct evidence for polyspermy induced polyploidy. **Nature Communications**, v.8, p.1033, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01044-y>

NOBREGA, D. S.; PEIXOTO, J. R.; VILELA, M. S.; FALEIRO, F. G.; GOMES, K. P. S.; SOUSA, R. M. D.; NOGUEIRA, I. Agronomic descriptors and ornamental potential of passion fruit species. **Ornamental Horticulture**, v.23, p.357-362, 2017. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v23i3.1053>

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agronômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, v.6, p.143-158, 2005.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; VIEIRA, E. A.; VIANA, M. L. Diversidade genética de *Passiflora* spp. baseada em descritores morfoagronômicos. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v.117, p.293-304, 2018.

OTONI, W. C.; PAIM PINTO, D. L.; ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; DIAS, L. L. C.; SILVA, M. L.; SILVA, C. V.; LANI, E. R. G.; SILVA, L. C.; TANAKA, F. A. O. Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passifloras* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi; Narosa Publishing House, p.1-17, 2013.

PAIM PINTO, D. L.; ALMEIDA, A. M.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.521-530, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0003-y>

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.381-390, 2014.

PHILLIPS, W.; RANNEY, T.; TOUCHELL, D. H.; EAKER, T. A. Fertility and reproductive pathways of triploid flowering pears (*Pyrus* sp.). **Horticultural Science**, v.51, p.968-971, 2016. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.8.968>

PREISIGKE, S. C.; SILVA, L. P.; SERAFIM, M. E.; BRUCKNER, C. H.; ARAÚJO, K. L.; NEVES, L. G. Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. **Summa Phytopathologica**, v.43, p.321-325, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100->

5405/175390.

RANGEL JUNIOR, I. M.; VASCONCELLOS, M. A. S.; ROSA, R. C. C.; CRUVINEL, F. F. Floral biology and physicochemical characterization of wild passion fruit *Passiflora setacea* d.C BRS Pérola do Cerrado cultivated in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.40, p.1-9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018041>

REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* flavicarpa. **Acta Horticulturae**, v.738, p.425-431, 2007.

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**, v.120, p.1087-1098, 2015

ROCHA, D. I.; BATISTA, D. S.; FALEIRO, F. G.; ROGALSKI, M.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; YOCKTENG, R.; SILVA, M. L.; SOARES, W. S.; PINHEIRO, M. V. M.; PACHECO, T. G.; LOPES, A. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. E.; PLIEGO-ALFARO, F.; HORMAZA, J. I. (eds). **Biotechnology of fruit and nut crops**. 2nd edition. Boston: CABI, 2020. p.381-408.

RODRIGUES-PEÑA, N.; STONER, K. E.; ORTIZ-CÉZAR, M. F.; AYALA-BERDON, J.; MUNGUÍA-ROSAS, M. A.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; SCHONDUBE, J. E. Factors affecting nectar sugar composition in chiropterophilic plants. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v.87, p.465-473, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.03.002>

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v.243, p.281–296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>

SERAPIGLIA, M. J.; GOUKER, F. E.; SMART, L. B. Early selection of novel triploid hybrids of shrub willow with improved biomass yield relative to diploids. **BMC Plant Biology**, v.14, p.74, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-74>

SIEBRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. R.; MARTINS, A. O. B. P. B.; SIEBRA, D. C.; ALBURQUERQUE, R. S.; LEMOS, I. C. S.; DELMONDES, G. A.; TINTINO, S. R.; FIGUEIREDO, F. G.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Saudi Journal of Biological Sciences, v.25, p.37-43, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.019>

SILVA, M.L.; PAIM PINTO D.L.; GUERRA M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for wild passion fruits species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p.47-54, 2009.

SIMON-PORCAR, V. I.; SILVA, J. L.; HIGGINS, J. D.; VALLEJO-MARIN, M. Recent autopolyploidization in a wild population of *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.185, p.189–207, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box052>

SIMON-PORCAR, V. I.; SILVA, J. L.; HIGGINS, J. D.; VALLEJO-MARIN, M. Recent autopolyploidization in a wild population of *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.185, p.189–207, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box052>

SOZO, J. S.; CRUZ, D. C.; PAVEI, A. F.; PEREIRA, I. M.; WOLFART, M. In vitro culture and phytochemical analysis of *Passiflora tenuifila* Killip. and *Passiflora setacea* D.C. (*Passifloraceae*). In: JAIN, S.M. (ed.) **Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. Methods in Molecular Biology**, 2nd ed. New York: Humana Press, 2016. p.13-30.

SPOELHOF, J. P.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research. **Journal of Systematics and Evolution**, v.55, p.340-352, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12253>

SUKMARA, E.; SUKAMTO, L. A.; BINTANG, M. Induksi dan karakter pertumbuhan kalus triploid dari endosperma avokad (*Persea Americana* Mill.). **Current Biochemistry Journal**, v.1, p.20-28, 2014.

SUMARJI, M. P.; SUPARNO, M. H. The effectiveness of colchisin giving on watermelon ploidization (*Citrullus vulgaris* Schard). **International Journal of Applied Environmental Sciences**, v.12, p.1951-1967, 2017.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.23-29, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9795-4>

THANG, B. V.; VIET, N. V.; NAM, V. Q.; HOANG, T. T.; NHUT, D. T. Triploid plant regeneration from immature endosperms of *Melia azedazach*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.133, p.351-357, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1387-8>

THOMAS, T. D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, p.114, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>

TIKU A.R.; RAZDAN M.K.; RAINA S.N. Production of triploid plants from endosperm cultures of *Phlox drummondii*. **Biologia Plantarum**, v.58, p.153-158, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0372-7>

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v.18, p.411-424, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>

VIANA, A. J. C.; SOUZA M. M.; ARAÚJO I. S.; CORREA R. X.; AHNERT D. Genetic diversity determined by morphological and molecular characterization in wild *Passiflora* L. species with ornamental potential. **Biologia Plantarum**, v.54, p.535–538. 2010.

VICHIATO, M. R. D. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CASTRO, D. M. D. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, n. 3, p. 154-159, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a23>

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**, v.52, p.41–54, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17221/151/2015-CJGPB>

WINARTO, B.; SOEHENDI, R.; HARWANTO. An in vitro endosperm culture of *Anthurium*. **Advances in Agricultural Science**, v.6, p.13-25, 2018.

ZERAIK, M. L. P.; CÍNTIA, A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 459–471, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300026>

CAPÍTULO III

Comportamento de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast. induzidas por biostimulantes *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* na produção de enzimas oxidativas e lítica

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem a capacidade de reagir aos ataques das doenças por meio de respostas de defesa, as quais são ativadas pela interação de uma molécula indutora com as proteínas da membrana da célula vegetal, sem alteração do genoma da planta (Baysal et al., 2013). Essas respostas estão associadas a reações bioquímicas e fisiológicas, as quais promovem a defesa vegetal, sendo denominada de indução de resistência (Mattos Jr. et al., 2010; Lorenzetti et al., 2018).

O uso das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*, têm desempenhado ação sinalizadora de defesa das plantas contra patógenos ao promover a resistência sistêmica induzida (RSI). A redução dos sintomas de doenças em plantas ocorre devido aos estímulos proporcionados por essas bactérias no incremento das concentrações de proteínas relacionadas à patogênese e na ativação das enzimas oxidativas (peroxidase e polifenoloxidase), relacionadas à redução da severidade da doença e a hidrolítica (β -1,3 glucanase) que atua na degradação da parede celular do patógeno, dificultando ou impedindo sua ação patogênica (Higaki; Araujo, 2012; Shafie et al., 2016; Bulegon et al., 2016; Lastochkina et al., 2019).

Os mecanismos de ação das cepas de *B. subtilis* possuem amplo espectro, promovendo efeito protetor a diversas espécies de plantas contra pragas (García-Gutiérrez et al., 2013; Prabhukarthikeyan et al., 2017), estresse salino (Lastochkina et al., 2017) doenças de ciclo produtivo (Adam et al., 2014; Chandrasekaran; Chun, 2016) e de pós-colheita (Kim et al., 2015; Kilani-Feki et al., 2016; Arroyave-Toroa et al., 2017). Similarmente, a aplicação de *A. brasilense* têm desencadeando resistência, auxiliando no controle de doenças (Sankari et al., 2011) estresse hídrico (Bulegon et al., 2016) e estresse salino (Fasciglione et al., 2015).

Plantas poliploides atualmente são importantes cultivares de interesse na agricultura moderna (Corneillie et al., 2019; Liquin et al., 2019). A poliploidia altera

significativamente as funções bioquímicas dos genomas das plantas. As alterações fisiológicas imediatas nos poliploides permitiram a adaptação das novas plantas em ambientes com condições desafiadoras (Deng et al., 2012; Chao et al., 2013; Elmaghrabi et al., 2013; Padoan et al., 2013; Wang et al., 2013; del Pozo e Ramirez-Parra, 2014; Bertrand et al., 2015; Nakel et al., 2017; Hias et al., 2018; Nezhad; Mansouri, 2019). Desde então, a poliploidização é reconhecida como a principal ferramenta para expansão dos genes de resistência em plantas cultivadas (Zhang et al., 2014).

Entre as plantas poliploides, os triploides são os mais escassos na natureza e se originam principalmente da fertilização por gametas não reduzidos ou de cruzamentos entre ploidia (Ramsey; Schemske 1998; Husband, 2004; Wang et al, 2016). A regeneração in vitro dos tecidos do endosperma tem sido considerada um método direto para a produção de plantas triploides estáveis geneticamente, devido à natureza triploide do endosperma (Wang et al, 2016; Antoniazzi et al., 2018; Faria et al., 2018; Mikovski et al., 2019).

Plantas triploides de *P. cincinnata* pela primeira vez foram regeneradas in vitro com o uso de tecidos endospermico como fonte de explante por meio da embriogênese somática, assim, a investigação do comportamento das plantas triploides ($3n=27n$) na produção de enzimas de resistência com atividades oxidativas (peroxidases e polifenoloxidasas) e hidrolítica (β -1,3-glucanases) quando bioestimuladas por micro-organismos, sugerem alguns questionamentos como exemplo: Será que plantas triploides ($3n$) de *P. cincinnata* expressam maior quantidade de enzimas envolvidas na defesa de planta comparadas as suas parentais diploides? E, quando bioestimuladas podem ocorrer significativas diferenças de produção entre as enzimas envolvidas na resistência? As respostas para estas perguntas abrem novas perspectivas para o melhoramento genético de *Passiflora* e a possibilidade de transferência para a principal espécie comercial *P. edulis*.

Diante destas perspectivas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast. induzidas por biostimulantes *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* na produção de enzimas oxidativas e lítica peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção material vegetal

2.1.1. Plantas triploides

Sementes de *P. cincinnata* foram isoladas de frutos maduros e, após a retirada do arilo, foram secadas ao ar livre. Com auxílio de uma mini morsa, removeu-se o tegumento das sementes. Logo após, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por três minutos, seguido em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) durante 25 minutos acrescido de 3 gotas do agente surfactante de Tween-20^o em 100 mL de solução. Após, as sementes foram enxaguadas por quatro vezes em água destilada e autoclavada e mantidas em overnignt para facilitar o isolamento dos endospermas.

Os endospermas foram isolados assepticamente dos embriões zigóticos e cultivados em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm contendo 30 mL do meio de indução composto por sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) (Acumedia®) 4,5% (p/v), mio-inositol 0,01% (p/v), sacarose 3% (p/v) e 8 gL⁻¹ de ágar (p/v) como agente gelificante, acrescido da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e da citocinina benziladenina (BA). As concentrações dos reguladores de crescimento para a indução da embriogênese foram com 18,1 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA (Silva et al., 2009). O pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1 e o meio de cultura foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C a uma pressão de 1,1 atm. Os endospermas inoculados nas placas de Petri foram cultivados em sala de cultivo por 30 dias, na ausência de luz, a temperatura de 25 ± 2 °C.

Massas pró-embriogênicas com 30 dias de cultivo in vitro foram transferidas para histodiferenciação em placas contendo meio MS^{1/2} na metade das concentrações como anteriormente descrito. As culturas foram mantidas sob luminosidade com fotoperíodo de 16 horas e 36 µmol m⁻²s⁻¹ de irradiância providas de lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), na temperatura e condições de crescimento descritas anteriormente até a conversão dos embriões somáticos em plantas. Aos 90 dias de cultivo plântulas completas com aproximadamente 10 cm de comprimento foram obtidas. Após foram transferidas para transferidas para copos

plásticos contendo substrato Plantmax®. Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes, permanecendo incubadas sob fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 26 ± 2 °C por aproximadamente 20 dias e, após foram levadas para casa de vegetação e os sacos plásticos removidos gradativamente durante 10 dias. O nível de ploidia das plantas regeneradas in vitro foram previamente confirmadas $3n=27n$.

2.2 Ensaio In vitro

2.2.1 Obtenção dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram a bactéria *Bacillus subtilis*, isolado de um produto comercial e as cepas de *Azospirillum brasilense*, linhagens AbV5 e AbV6, fornecido pela Embrapa Soja, multiplicados, com concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹.

2.2.2 Ensaio in vivo

As plantas diploides (controle) e triploides de *P. cincinnata* foram cultivadas em ambiente semicontrolado por meio de sistema de aspersão automatizado, mantendo-se a temperatura ambiente, no período de janeiro de 2019 a janeiro de 2020. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 30 dm³, contendo uma mistura de solo e substrato na proporção 3:1. Os vasos foram espaçados com 1,5 m entre linhas e 4 m entre plantas. O sistema de condução foi em espaldadeira vertical com fio de arame liso a 1,8 m de altura, sem eliminação dos brotos terminais e dos ramos laterais.

A adubação foi realizada por aplicação via foliar, na formulação N-10 P-10 K-10 + M (níveis de garantia dos nutrientes (P/P%): N= 10; P₂O%= 10; K₂O= 10; Fe= 0,1%; Zn= 0,1%; Cu= 0,1%; S= 0,3%; Mn= 0,5%) uma vez ao mês na fase vegetativa e de 15 em 15 dias na fase reprodutiva, na dosagem de 3-9 litros/hectare.

2.2.3 Delineamento Experimental e tratamentos

Foram utilizados dois genótipos de *P. cincinnata* (diploide – $2n$ e triploide – $3n$), três tratamentos: TA= *Azospirillum brasilense*; TB= *Bacillus subtilis* e; TC= controle (água), com três repetições e quatro tempos de coleta (T0= Tempo Zero; T24= 24 horas após aplicação; T48= 48 horas após aplicação; T72= 72 horas após aplicação).

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 95% de confiabilidade no programa Genes (Cruz, 2007)

2.2.4 Aplicação dos indutores de resistência

As plantas receberam os tratamentos dos indutores por meio de pulverização total das plantas, *B. subtilis* ($1,0 \cdot 10^{10}$ UFC mL⁻¹) e *A. brasilense* ($2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), na dose de 10mL⁻¹/litro de calda e o controle com água.

2.3 Determinação da atividade da enzimática

2.3.1 Coleta das amostras

Para determinar as atividades das enzimas nas mudas de *P. cinnamomum* submetidas aos tratamentos, amostras foliares (2 folhas por planta) foram coletadas nos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos indutores. O tecido foliar foi coletado do terço médio da planta, colhendo folhas sadias com auxílio de uma tesoura e rapidamente acondicionando-as em envelopes de alumínio e saquinhos plásticos devidamente identificados e mantidos no gelo e em seguida armazenadas a -80 °C.

Para o preparo das amostras foliares, foi utilizado 0,2 g de folhas congeladas, e, com auxílio de almofariz e pistilo previamente resfriado à temperatura de 4 °C, as folhas foram maceradas e homogeneizadas mecanicamente por 2 minutos. Todos os resultados dos ensaios das atividades enzimáticas, correspondem à média de quatro replicatas, com exceção da proteína total, que foi em triplicata. Como branco, utilizou-se a solução dos reagentes para leitura de cada atividade enzimática, substituindo a adição do extrato proteico por água destilada.

2.3.2 Atividade de peroxidases

No preparo das amostras foliares, foi adicionado 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,2) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM. O homogenato foi centrifugado a 20.000 *g* durante 30 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante (extrato proteico) obtido foi transferido para um eppendorf e acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo para posterior determinação. A

mistura da solução constituiu de 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM, e 10 µL do extrato proteico. A reação foi incubada por 4 minutos em banho-maria a 30 °C. Os valores de densidade ópticas foram obtidas em espectrofotômetro a 470 nm, sendo expressos em absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹.

2.3.3 Atividade de polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). Foi adicionado 2 mL de tampão acetado de sódio 0,1 M (pH 5,0) no preparo das amostras foliares, e, as misturas foram centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos a 4 °C, obtendo-se o sobrenadante (extrato proteico), que foi transferido para um eppendordorff e acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo para posterior determinação. A reação foi obtida por meio da adição de 100 µL do extrato proteico em 900 µL do tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,8), contendo catecol 20 mM. A atividade de polifenoloxidase foi mensurada através da oxidação do catecol convertido em quinona. A reação foi incubada por 4 minutos em banho-maria a 30 °C e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, sendo expressos em absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹.

2.3.4 Atividade de β-1,3-glucanases

Para determinação espectrofotométrica da atividade de β-1,3-glucanases utilizou-se da metodologia descrita por Lever (1972), com modificações. A atividade de β-1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina. Para obtenção do extrato proteico, 2 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), contendo 1 mM de PMSF (fenilmetilsulfonilflúor) e 200 mg de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) foi adicionado no preparo das amostras foliares e, a mistura, foi centrifugada a 20.000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante recuperado para utilização no ensaio enzimático. O extrato proteico obtido transferido para um eppendordorff e acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo para posterior determinação. A reação envolveu 230 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 250 µL da solução de substrato da laminarina

(4 mg mL⁻¹) e 20 µL do extrato vegetal, que foi incubado a 45°C por 30 min. Após esse período, a reação foi paralisada com a adição de 500 µL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e em seguida, essa mistura foi aquecida a 100 °C, por 5 min, e resfriada em gelo até a temperatura de 30 °C para determinação dos valores de absorbância a 540 nm e comparadas com os padrões de glicose. A quantidade de açúcares redutores formado foi quantificado pela curva padrão de concentrações de glicose ($Y=3,4314X-0,0104$), onde Y é a absorbância a 540 nm e X a concentração de açúcares redutores (mg) e os resultados foram expressos em unidades de variação da absorbância por minuto por mg de proteína. (expressa em equivalente mg de glicose.min⁻¹ mg proteína⁻¹) (Apêndice).

2.3.5 Determinação da proteína total

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), que mede a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250. Consiste em adicionar em um tubo de ensaio 50 µL do extrato enzimático e 2,5 mL de reagente Bradford, homogeneizados sob agitação. Após 15 min em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 595 nm de absorbância. Para o branco, foi utilizado 50 µL de água destilada com 2,5 mL de reagente de Bradford. A curva-padrão utilizada foi por meio da equação: $y = 15,05x + 0,0003$ ($R^2 = 0,9919$) e os resultados de proteína total expressos em miligramas por mL.

3. RESULTADOS

Foram observadas variações fisiológicas na produção das enzimas oxidativas e hidrolítica entre as plantas diploides e triploides de *P. cinnamomum*. A indução da ploidia afetou significativamente a atividade das enzimas envolvidas na resistência de plantas. A quantificação das enzimas peroxidase (Figura 1A-B), polifenoloxidase (Figura 1C-D) e β-1,3-glucanase (Figura 1E-F) demonstraram que as plantas triploides controle, ou seja, as que não receberam aplicações dos indutores, produziram maior atividade enzimática em todos os tempos de coletas, comparadas com as plantas controle das

parentais diploides, em 32,58%, 22,13% e 29,79% para as enzimas peroxidase, polifenoxidase e β -1,3-glucanase, respectivamente (Figura 1).

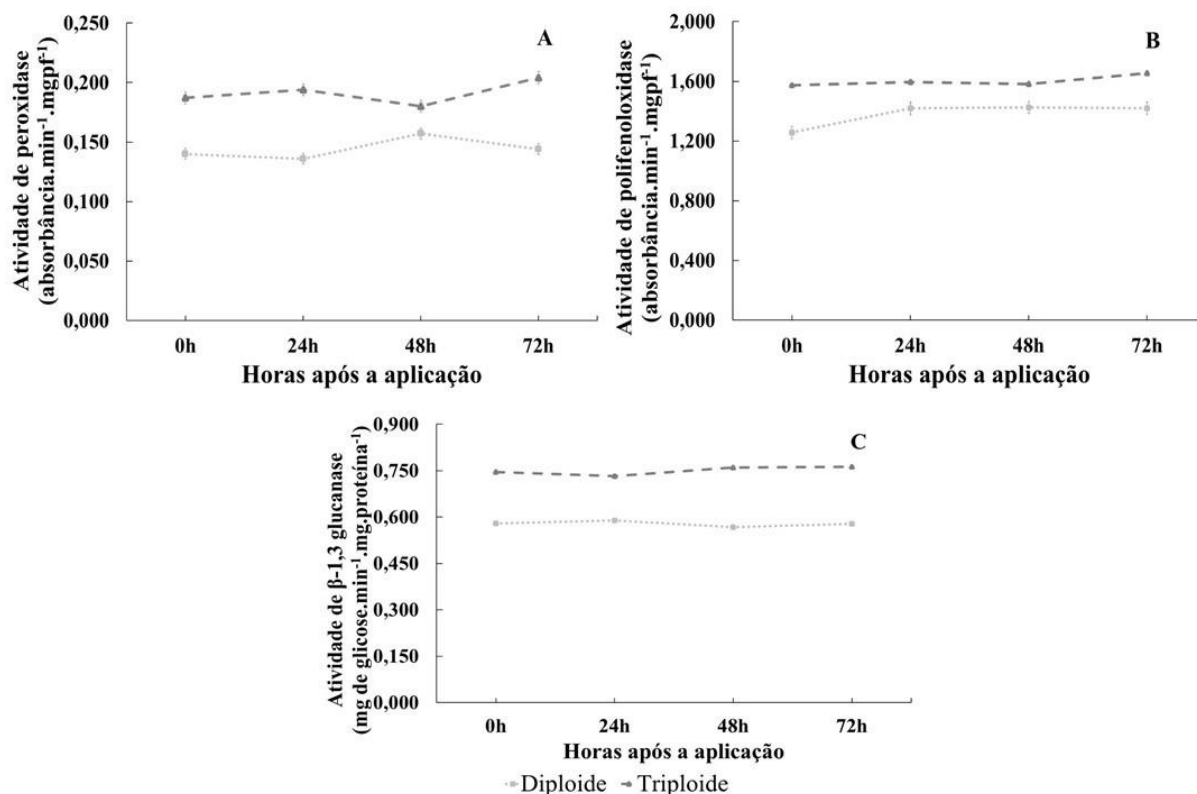


Figura 1. Quantificação das atividades enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanases do tecido foliar das plantas controles diploides e triploides de *P. cinnamomum* pulverizadas com as bactérias indutoras biológicas *A. brasilense* e *B. subtilis* e água (controle) em diferentes tempos de coleta. A) Atividade enzimática de peroxidase das plantas diploides germinadas de sementes e plantas triploides regeneradas de endosperma; B) Atividade enzimática de polifenoloxidase das plantas diploides germinadas de sementes e plantas triploides regeneradas de endosperma; C) Atividade enzimática de β -1,3-glucanases das plantas diploides germinadas de sementes e plantas triploides regeneradas de endosperma

As plantas controle das parentais diploides expressaram menor medida de produção da enzima peroxidase as 24h com 0,136 e, em 48h produziu a maior atividade enzimática, 0,157 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹, conforme Figura 2A. Os resultados mostram baixa variação da atividade de peroxidase nas plantas controle triploides, expressando menor valor em 48h, com 0,180 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹ e maior em 72h, exibindo 0,204 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹ (Figura 2A).

A mesma ocorrência foi observada nas atividades das enzimas polifenoloxidase e β -1,3-glucanase. Os índices das atividades dessas enzimas nas plantas triploides e diploide apresentaram poucas variações. Os valores manifestados pelas plantas controle

dos triploides mostraram maior atividade enzimática em 72h para polifenoxidase (1,654 absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) (Figura 2B) e β -1,3-glucanase (0,763 mg de glicose.min⁻¹.mg.proteína⁻¹) (Figura 2C), enquanto que as plantas controle diploides exibiram maior quantificação da enzima polifenoloxidase as 48h (1,424 absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) e para β -1,3-glucanase as 24h (0,589 mg de glicose.min⁻¹.mg.proteína⁻¹).

As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR), *A. brasilense* e *B. subtilis*, foram eficazes na ativação das enzimas relacionadas aos mecanismos de resistência e defesa vegetal nas plantas diploides e triploides (Figura 2A-F). A bactéria *A. brasilense* proporcionou os maiores valores na indução das atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e *B. subtilis* induziu maior atividade de β -1,3-glucanases nas folhas de *P. cinnamomata*.

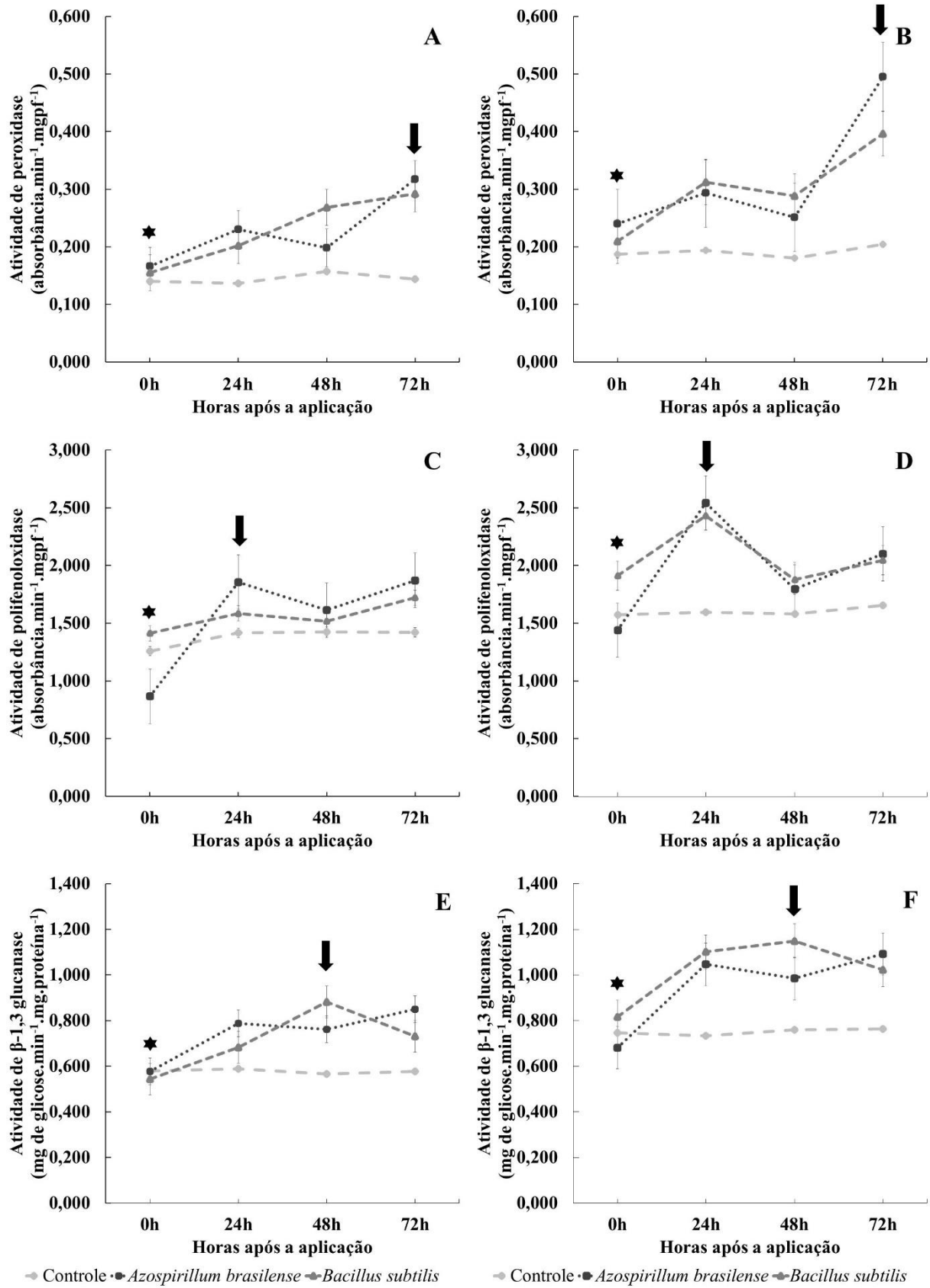


Figura 2. Quantificação das atividades enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanases do tecido foliar das plantas diploides e triploides de *P. cincinnata* pulverizadas com as bactérias indutoras biológicas *A. brasilense* e *B. subtilis* e água (controle) em diferentes tempos de coleta. A) Atividade enzimática de peroxidase das plantas triploides regeneradas de endosperma; B) Atividade enzimática de peroxidase das plantas diploides germinadas de sementes; C) Atividade enzimática de polifenoloxidase das plantas triploides regeneradas de endosperma; D) Atividade enzimática de polifenoloxidase das plantas diploides germinadas de sementes; E) Atividade enzimática de β -1,3-glucanases das plantas triploides regeneradas de endosperma; F) Atividade enzimática de β -1,3-glucanases das plantas diploides germinadas de sementes. As setas indicam os picos de maior atividade enzimática.

Em 24h após as aplicações das rizobactérias, as plantas triploides e diploides que receberam os tratamentos apresentaram aumento significativo nas atividades enzimáticas em relação ao tempo de coleta 0h. Na Figura 2 pode-se observar os resultados de todos os tempos de coletas da atividade da peroxidase. A Figura 2A exibe a produção da atividade enzimática das plantas diploides, revelando a máxima quantificação da enzima peroxidase em 72h (0,317 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) após aplicação de *A. brasilense* e menor quantidade em 24h (202 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹), através da indução foliar com o bioestimulante *B. subtilis*. As plantas triploides oscilaram nas atividades enzimáticas com maior pico as 72h (0,495 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) com o agente indutor *A. brasilense*, e menor ação em 24h (0,242 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) induzida pela bactéria *B. subtilis* (Figura 2B).

A determinação da polifenoloxidase avaliada a partir de folhas das plantas triploides e diploides de *P. cincinnata* está representada pela Figura 1C-D. As plantas diploides e triploides mostraram-se semelhantes quanto as atividades enzimáticas após aplicação dos indutores biológicos. A pulverização de *A. brasilense* nas plantas diploides possibilitou o pico de atividade de polifenoloxidase as 24h (1,616 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) e a menor atividade foi relatada em 48h (1,515 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) com *B. subtilis* (Figura 2C). Já os maiores valores expressados na atividade enzimática foi observada nas plantas triploides, com a máxima e baixa atividade alcançada através da aplicação de *A. brasilense* em 24h (2.540 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) e 48h (1,794 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹), respectivamente (Figura 2D).

A aplicação da rizobactéria *B. subtilis* foi a que promoveu maior acréscimo na atividade da enzima β -1,3 glucanase nas plantas diploides (Figura 2E) e triploides

(Figura 2F), com maior pico de ativação as 48h, com valores de 1,115 e 0,881 de mg de glicose.min⁻¹.mg.proteína⁻¹, respectivamente. A bactéria *B. subtilis* também proporcionou a menor quantificação da atividade da enzima no tecido foliar das plantas diploides, com 0,683 de mg de glicose.min⁻¹.mg.proteína⁻¹ as 24h após a aplicação. Nas plantas triploides, verificou-se que a ação da *A. brasilense* causou a mais baixa atividade as 48h (0,984 de mg de glicose.min⁻¹.mg.proteína⁻¹) após o período de indução.

Os resultados demonstram que todas as bactérias bioestimulantes apresentaram capacidade de ativação das enzimas de defesa de planta, sendo que o comportamento é distinto em relação aos tempos de coleta, fato característico considerando os diferentes modos de ações dos agentes indutores.

4. DISCUSSÃO

Comparativamente ao seu homólogo diploide, o maracujazeiro triploide de *P. cincinnata* apresentou multiplicidades nas características genéticas, fenotípicas e na expressão gênica. Aqui, pela primeira vez é descrita a análise quantitativa de atividade das enzimas de resistência em plantas triploides do gênero *Passiflora*. Foi possível observar que plantas controle dos triploides expressaram os maiores valores das atividades enzimáticas frente ao controle do seus parentais diploides, demonstrando que a triploidia aumentou o nível de expressão de genes relacionados as enzimas de resistência. A proporção de incremento das atividades enzimáticas nas plantas triploides em função do aumento no nível de ploidia foi de 32,58%, 22,13% e 29,79% para as enzimas peroxidase, polifenoxidase e β -1,3-glucanase, respectivamente.

O aumento da atividade enzimática é decorrente do acréscimo no nível de ploidia (Zhang et al. 2010; Shafieizargar et al. 2013; Wang et al., 2013; Talebi et al., 2017; Liqin et al., 2019; Nezhad; Mansouri, 2019) e é relatado como o principal mecanismo de expressão dos genes de resistência (Zhang et al., 2014), sugerindo que os poliploides são mais eficientes na sinalização no nível de expressão gênica em relação aos diploides (Bertrand et al., 2015). Neste sentido, Wang et al. (2013) relataram que os tetraploides de *Robinia pseudoacacia* apresentaram atividade de peroxidase significativamente maiores do que as plantas diploides.

De acordo com Talebi et al. (2017), à medida que se aumenta o número de cromossomos, as atividades enzimáticas, o conteúdo de proteína e de DNA por célula também são alterados após a poliploidização e, as plantas frequentemente apresentam um novo fenótipo com características diferentes dos seus progenitores diploides, sugerindo que conjuntos extras de cromossomos podem aumentar a expressão gênica.

Sabe-se, até o momento, que o aumento de ploidia proporciona a nova planta tolerância a seca (Padoan et al., 2013; del Pozo e Ramirez-Parra, 2014), resistência ao frio (Deng et al., 2012; Bertrand et al., 2015), tolerância ao estresse salino (Chao et al., 2013; Elmaghrabi et al., 2013; Wang et al., 2013; Nezhad; Mansouri, 2019), tolerância a herbicida (Nakel et al., 2017), resistência a patógenos (Hias et al., 2018) e que a ocorrência desses fenômenos vem sempre acompanhado do aumento na expressão de genes de resistência, enzimas protetoras ou pequenas moléculas relacionadas a resistência (Caverzan et al., 2012; Wu et al., 2013). Além da sinalização efetiva, as plantas poliploides também podem regular positivamente os genes de resistência envolvidos nas proteínas relacionadas à patogênese (del Pozo e Ramirez-Parra, 2014; Bertrand et al., 2015; Tamayo-Ordoñez et al., 2016; Long et al., 2019). Segundo Du et al. (2020) a superioridade no crescimento vegetativo de plantas triploides de *Populus* em relação aos diploides é devido a maior expressão dos genes das proteínas relacionadas à patogênese e as enzimas protetoras.

A aplicação de *A. brasilense* aumentou a atividade das duas enzimas oxidativas e da hidrolítica, proporcionando os maiores picos de atividade enzimática nas enzimas peroxidase ($0,495$ de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) e polifenoxidase (2.540 de absorbância.min⁻¹.mgpf⁻¹) as 72h nas plantas triploides. Estudos recentes têm reconhecido a eficiência da bactéria *A. brasilense* na indução de resistência sistêmica em plantas com resultados positivos no biocontrole a insetos praga e a fitopatógenos (Sankari et al., 2011; Alen'kina et al., 2014).

As características mais importantes das cepas Ab-V5 e Ab-V6 é capacidade de induzir genes relacionados à tolerância aos estresses bióticos e abióticos em plantas e de transportar vários genes de resposta ao estresse oxidativo (Hungria et al., 2018). A inoculação das folhas de milho com as cepas Ab-V5 e Ab-V6 aumentaram em 10,4 e 5,5 vezes, respectivamente, a expressão do gene das enzimas oxidativas e das proteínas

PR, fornecendo proteção contra os efeitos negativos do estresse salino (Fukami et al., 2017). A aplicação foliar de *A. brasilense* em *Urochloa ruziziensis* aumentou a atividade de peroxidase, tornando a planta mais resistente ao déficit hídrico (Bulegon et al., 2016).

A rizobactéria *B. subtilis* induziu a ativação das enzimas peroxidase, polifenoloxise e β -1,3-glucanase, com maior expressão de atividade nas plantas diploides e triploides da enzima hidrolítica. Dentre os mecanismos de ação de *B. subtilis* está a indução de resistência sistêmica, com eficiente controle contra nematoides e doenças foliares (Ferraz et al., 2014; Silva et al., 2018). As folhas de algodoeiro cultivadas com sementes inoculadas com *B. subtilis* apresentaram maior atividade da enzima peroxidase, atuando de forma eficaz no controle dos nematoides (Higaki; Araujo, 2012).

As plantas triploides de *P. cincinnata* que não receberam as aplicações dos indutores já expressavam maior atividade das enzimas de resistência que os diploides, devido as características genéticas únicas dos triploides. As pulverizações com os bioestimulantes *A. brasilense* e *B. subtilis* proporcionou incrementos as atividades que já eram altas dos triploides indicando que ocorreu interação entre planta-indutor, possibilitando a ativação imediata dos mecanismos de defesa contra patógenos por esses agentes bióticos.

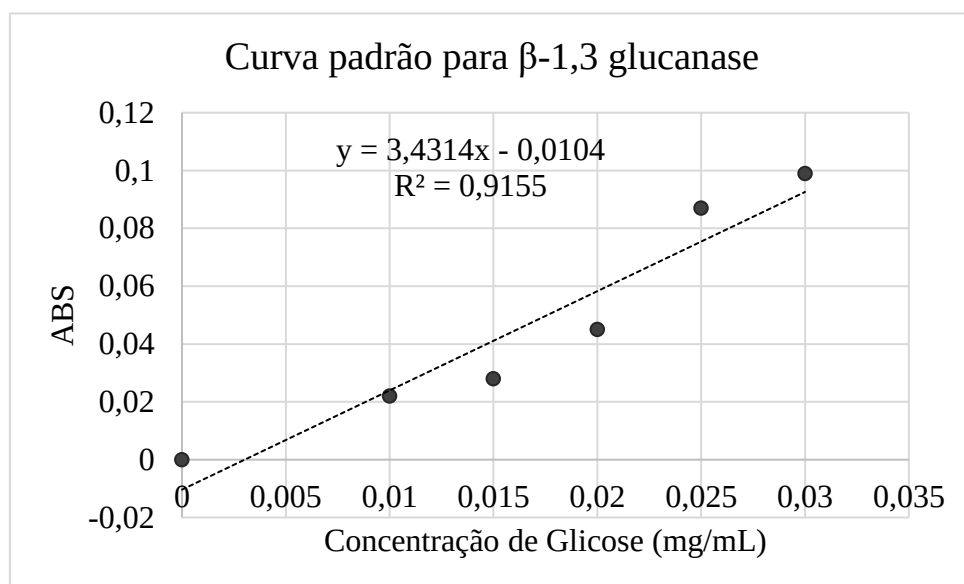
Alguns compostos produzidos pelas plantas degradam a parede celular do patógeno (β -1,3-glucanase) enquanto outros restringem o desenvolvimento de patógenos pela formação de barreiras estruturais (peroxidase e polifenoloxidase) (Stangarlin et al., 2011). A maior expressividade dos mecanismos latentes das plantas triploides produzidas in vitro com o uso do endosperma de *P. cincinnata* e a capacidade de interação das plantas com os micro-organismos, abrem novas abordagens no melhoramento genético para o gênero.

5. CONCLUSÕES

As plantas triploides de *P. cincinnata* apresentaram atividades enzimáticas superiores as plantas diploides. A aplicação dos bioestimulantes *A. brasilense* e *B. subtilis* mostraram-se eficientes na indução dos mecanismos latentes das plantas

diploides e triploides de *P. cincinnata*, comprovados através da ativação e das maiores expressões dos valores quantificados das enzimas peroxidase, polifenoxidase e β -1,3-glucanase, comparados ao tempo de coleta inicial.

APÊNDICE



Apêndice: Curva padrão para glicose a 540 nm para determinação da atividade de β -1,3 glucanase em folhas *Passiflora cincinnata*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **Plos One**, v.9, p.1-8, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090402>
- ALEN'KINA, S. A.; BOGATYREV, V. A.; MATORA, L. Y.; SOKOLOVA, M. K.; CHERNYSHOVA, M. P.; TRUTNEVA, K. A.; NIKITINA, V. E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial–plant root interactions. **Plant and Soil**, v.381, p.337–349, 2014.
- ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v.114, p.195-200, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- BAYSAL, Ö.; LAI, D.; XU, H.H.; SIRAGUSA, M.; ÇALISKAN, M.; CARIMI, F.; SILVA, J. A. T.; TÖR, M. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. **Research Articles**, v.8, p.1-12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>
- BERTRAND, B.; BARDIL, A.; BARAULLE, H.; DUSSET, S.; DOULBEAU, S.; DUBOIS, E.; SEVERAC, D.; DEREPPER, A.; ETIENNE, H. The greater phenotypic homeostasis of the allopolyploid coffee arabica improved the transcriptional homeostasis over that of both diploid parents. **Plant and Cell Physiology**, v.56, p.2035-2051, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv117>
- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, p.343-349, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v46a1489>
- CAVERSAN, A.; PASSAIA, G.; ROSA, S. B.; RIBEIRO, C. W.; LAZZAROTTO, F.; MARGIS-PINHEIRO, M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, p.1011-1019, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>
- CHANDRASEKARAN, M.; CHUN, S. C. Induction of defence-related enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants treated with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. **Biocontrol Science and Technology**, v.26, p.1366-1378, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1205181>
- CHAO, D. Y.; DILKES, B.; LUO, H.; DOUGLAS, A.; YAKUBOVA, E.; LAHNER, B.; DE, S. Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in

Arabidopsis. **Science**, v.341, p.658–659, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1240561>

CORNEILLIE, S.; DE ESTORME, N.; VAN ACKER, R.; FANGEL, J. U.; DE BRUYNE, M.; DE RYCKE, R.; GEELLEN, D.; WILLATS, W. G. T.; VANHOLME, B.; BOERJAN, W. Polyploidy affects plant growth and alters cell- wall composition. **Plant Physiology**, v.179, p.74-87, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>

DENG, B.; DU, W.; LIU, C.; SUN, W.; TIAN, S.; DONG, H. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? **Plant Growth Regulation**, vol. 66, pp. 37-47, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-011-9626-6>

dEL POZO, J. C.; RAMIREZ-PARRA, E. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *Arabidopsis* autotetraploids. **Plant, Cell and Environment**. v.37, p.2722–2737, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12344>

DU, K.; LIAO, T.; REN, Y.; GENG, X.; KANG, X. Molecular mechanism of vegetative growth advantage in allotriploid *Populus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.441, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21020441>

ELMAGHRABI, A. M.; OCHATT, S.; ROGERS, H. J.; FRANCIS, D. Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.114, p.61–70, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0306-2>

FASCIGLIONE, G.; CASANOVAS, E. M.; QUILLEHAUQUY, V.; YOMMI, A. K.; GOÑI, M. G.; ROURA, S. I.; BARASSI, C. A. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v.195, p.154-162, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.015>

FERRAZ, H. G. M.; RESENDE, R. S.; SILVEIRA, P. R.; ANDRADE, C. C. L.; MILAGRES, E. A.; OLIVEIRA, J. R.; RODRIGUES, F. A. Rhizobacteria induces resistance against Fusarium wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, v.73, p.274-283, 2014.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. hytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v.7, p.1-13, 2017.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, L.; ZERIOUH, H.; ROMERO, D.; CUBERO, J.; VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of

jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. **Microbial Biotechnology**, v.6, p.264-274, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>

HIAS, N.; SVARA, A.; KEULEMANS, J. W. Effect of polyploidisation on the response of apple (*Malus × domestica* Borkh.) to *Venturia inaequalis* infection. **European Journal of Plant Pathology**, v.151, p.515-526, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1395-2>

HIGAKI, W. A.; ARAÚJO, F. F. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestado. **Nematropica**, v.42, p.1-12, 2012.

HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R. A.; NOGUEIRA, M. A. Draft Genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. **American Society for Microbiology**, v.6, p.1-2, 2018.

HUSBAND, B. C. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.537-546, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00339.x>

KILANI-FEKI, O.; KHEDHER, S. B.; DAMMAK., M.; KAMOUN, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control**, v.95, p.73-82, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.005>

KIM, G. H.; KOH, Y. J.; JUNG, J. S.; HUR, J. S. Control of postharvest fruit rot diseases of kiwifruit by antagonistic bacterium *Bacillus subtilis*. **Acta Horticulturae**, v.1096, p.377-382, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1096.44>

LASTOCHKINA, O.; PUSENKOVA, L.; YULDASHEV, R.; BABAEV, M.; GARIPOVA, S.; BLAGOVA, D.; KHAIRULLIN, R.; ALINIAEIFARD, S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.121, p.80-88, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>

LIQIN, G.; JIANGUO, Z.; XIAOXIA, L.; GUODONG, R. Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. **Molecular Breeding**, v.39, p.69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0975-6>

LONG, Y. L. Screening and analysis on the differentially expression genes between diploid and autotetraploid watermelon by using of digital gene expression profile. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, p.180-190, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.174475>

LASTOCHKINA, O.; SEIFIKALHOR, M.; ALINIAEIFARD, S.; BAYMIEV, A.; PUSENKOVA, L.; GARIPOVA, S.; KULABUHOVA, D.; MAKSIMOV, I. *Bacillus* Spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plants**, v.8, p.97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8040097>

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v.44, p.45-50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/176895>

MATTOS JR.; D.; QUAGGIO, J. A.; BOARETTO, R. M. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, v.31, p.65-74, 2010.

MIKOVSKI, A. I.; SILVA, N. T.; SOUZA, C. DA S.; MACHADO, M. D.; OTONI, W. C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**, v.25, p. 189-199, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NAKEL, T.; TEKLEYOHANS, D. G.; MAO, Y.; FUCHERT, G.; VO, D.; GROß-HARDT, R. Triparental plants provide direct evidence for polyspermy induced polyploidy. **Nature Communications**, v.8, p.1033, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01044-y>

NEZHAD, F. S.; MANSOURI, H. Effects of polyploidy on response of *Dunaliella salina* to salinity. **Journal of the Marine Biological Association**, v.99, p.1041-1047, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0025315418001005>

PADOAN, D.; MOSSAD, A.; CHIANCONE, B.; GERMANA, M. A.; KHAN, P. S. S. V. Ploidy levels in *Citrus clementine* affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, p.283-290. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S2197-00252013000400006>

PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; UMAPATHY, K.; SORNAKILI, A.; THIRUVENGADAN, R. Induced resistance in tomato plants to *Helicoverpa armigera* by mixed formulation of *Bacillus subtilis* and *Beauveria bassiana*. **Research Journal of Biotechnology**, v.12, p.53-59, 2017.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p.467-501, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>

SANKARI, J. U.; DINAKAR, S.; SEKA, C. Dual effect of *Azospirillum* exopolysaccharides (eps) on the enhancement of plant growth and biocontrol of blast (*Pyricularia oryzae*) disease in upland rice (var. ASD-19). **Journal of Phytology**, v.3, p.16-19, 2011.

SHAFIEIZARGAR, A.; AWANG, Y.; JURAIMI, A. S.; OTHMAN, Comparative studies between diploid and tetraploid Dez Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] under salinity stress. **Australian Journal of Crop Science**, v.7, p.1436-1441, 2013.

SHAFIE R. M.; HAMED A. H.; EL-SHARKAWY, H. H. A. Inducing systemic resistance against Cucumber Mosaic Cucumovirus using *Streptomyces* spp. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v.44, p.127-142, 2016.

SILVA, C. M.; PINHEIRO, C. C. C.; SOUSA, I. A. L.; LINS, P. M. P.; SILVA, G. B.; CARVALHO, E. A. Controle biológico de *Bursaphelenchus cocophilus* por rizobactérias e *Trichoderma* spp. **Nativa**, v.6, p.233-240, 2018.

TALEBI S. F.; SAHARKHIZ M. J.; SHARAFI Y.; FARD R. F. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). **Caryologia**, v.70, p.184-193, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1318502>

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, p.18-46, 2011.

TAMAYO-ORDÓÑEZ, M. C.; ESPINOSA-BARRERA, L. A.; TAMAYO-ORDÓÑEZ, Y. J.; AYIL-GUTIÉRREZ, B.; SÁNCHEZ-TEYER, L. F. Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. **Euphytica**, v.209, p.1–22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1646-x>

WANG, Z.; WANG, M.; LIU, L.; MENG, F. Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.20299-20325, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms141020299>

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**, v.52, p.41–54, 2016.

WU L.; HAN Z.; WANG S.; WANG X.; SUN A.; ZU X. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. **Journal of Proteomics**, v.89, p.124–140, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.005>

ZHANG, J. Y.; HE, S. B.; LI, L.; YANG, H. Q. Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in

mesophyll. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.111, p.3015–3023, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1400542111>

CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível a obtenção de plantas triploides através da regeneração do tecido endospermico de *P. cincinnata* por meio da embriogênese somática. O sistema de regeneração comprovou ser eficiente para produção de plantas triploides geneticamente estáveis com $2n = 3x = 27$ cromossomos, através da citometria de fluxo.

As plantas triploides mostraram-se superiores nas características morfológicas e fisiológicas em relação as diploides. A planta apresenta folhas grandes e perenes, flores de maior tamanho e coloridas com longo período de florescimento. Os triploides de *P. cincinnata* apresentaram atividades enzimáticas superiores as plantas diploides. A aplicação dos bioestimulantes *A. brasilense* e *B. subtilis* mostraram-se eficientes na indução dos mecanismos latentes das plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*,

Novos conhecimentos na obtenção de triploidia através de sistema responsivos de regeneração *in vitro* e o comportamento das plantas triploides abrem novas perspectivas para o melhoramento de espécies de maracujazeiros para o mercado de plantas ornamentais e frutíferas.