

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO – PPGGM



CRISTIANA TORRES LEITE

**MUDANÇAS E DIFERENÇAS EPIGENÉTICAS NA ORGANOGÊNESE E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *PASSIFLORA*: INFLUÊNCIA DO
EXPLANTE E DAS CONDIÇÕES *IN VITRO***

ALEGRE - ES

2021



CRISTIANA TORRES LEITE

**MUDANÇAS E DIFERENÇAS EPIGENÉTICAS NA ORGANOGÊNESE E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *PASSIFLORA*: INFLUÊNCIA DO
EXPLANTE E DAS CONDIÇÕES *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dra. Milene Miranda Praça Fontes

Coorientador: Dr. Wellington Ronildo Clarindo

ALEGRE - ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

T693m Torres Leite, Cristiana, 1989-
Mudanças e diferenças epigenéticas na organogênese e embriogênese somática em Passiflora: influência do explante e das condições in vitro / Cristiana Torres Leite. - 2021.
67 f. : il.

Orientadora: Milene Miranda Praça Fontes.
Coorientador: Wellington Ronildo Clarindo.
Tese (Doutorado em Genética e Melhoramentos) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Cultura de tecidos vegetais. 2. Genética. 3. Epigenética.
4. Embriogênese somática indireta. 5. Organogênese indireta.
I. Miranda Praça Fontes, Milene. II. Ronildo Clarindo,
Wellington. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 631.523



CRISTIANA TORRES LEITE

**MUDANÇAS E DIFERENÇAS EPIGENÉTICAS NA ORGANOGÊNESE E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *PASSIFLORA*: INFLUÊNCIA DO EXPLANTE E
DAS CONDIÇÕES *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento.

26 de agosto de 2021.

Banca Examinadora:

Dr. Elias Terra Werner

Dr. João Paulo de Moraes Oliveira

Dra. Stéfanie Cristina de Oliveira

Dr. Wellington Ronildo Clarindo

Coorientador

Dra. Milene Miranda Praça Fontes

Orientadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO – PPGM



Dedico

Aos meus pais, meus irmãos, minha avó e minhas tias.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO – PPGM



“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio logístico no desenvolvimento desse projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento da pesquisa a qual esse trabalho está vinculado;

À minha orientadora Milene Miranda Praça Fontes e ao meu coorientador Wellington Ronildo Clarindo pela dedicação e esforço para a construção deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora;

À Darley Tavares e Ariane Vieira pela colaboração com a coleta e montagem do experimento;

Aos amigos dos Laboratórios de Citogenética e Cultura de Tecidos, Genética e Melhoramento Vegetal, Botânica e Bioquímica por participarem comigo no desenvolvimento desta pesquisa de maneira mais alegre e descontraída;

À minha família pelo apoio incondicional, em especial aos meus pais, irmãos, avós, tias e primos por acompanharem e apoiarem todas as minhas decisões;

À Victor Ponciano pelo apoio de todos os dias;

Aos meus amigos por participarem dessa etapa da minha vida.



BIOGRAFIA

CRISTIANA TORRES LEITE, filha de Eliani Pinheiro Torres Leite e Sabino Leite Neto, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, no dia 04 de outubro de 1989.

Em 2009/2 iniciou a graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre, colando grau em 2013/2. Durante a graduação foi monitora nas disciplinas de Organografia e Sistemática Vegetal e Biologia e Taxonomia de Criptógamas, além de voluntária em projetos de iniciação científica, onde desenvolveu atividades de pesquisa nas áreas de palinologia e biologia molecular de plantas.

Em 2014/2, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFES), linha de pesquisa Citogenética e Biologia Evolutiva, submetendo-se à defesa de dissertação em setembro de 2016. Logo após ingressou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFES) mantendo-se na linha de pesquisa e área do conhecimento, submetendo-se à defesa de tese em 2021.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental das diferentes etapas de indução da regeneração *in vitro*. EZI e EZM foram usados como explantes. A etapa de calogênese foi conduzida com os meios de indução (M1, M2, M3, M4 e M5) contendo as diferentes concentrações de 2,4-D. A etapa de regeneração foi conduzida com diferentes meios (M1, M6 e M7) nos quais os calos friáveis foram inoculados. Legenda: CA, carvão ativado; EZI, embrião zigótico imaturo; EZM, embrião zigótico maduro. Escala = 1 mm. 25

Figura 2 - Média do número de calos formados ao final de 35 dias a partir dos EZI e EZM inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento (M1) para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada tipo de explante, e com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). 29

Figura 3 – Gráficos de superfície de resposta mostrando a influência do tempo em dias (x) e da concentração de 2,4-D μM (y) na média de calos friáveis (z) formados a partir dos EZM das três espécies inoculadas em meio de indução de calogênese (M1 – M5) ($P < 0,05$). (A) *P. miniata*. (B) *P. cristalina*. (C) *P. foetida*. Abaixo de cada gráfico, os calos de cada espécie no meio M5 estão representados nos diferentes dias de avaliação (0; 7; 14; 21; 28; 35 dias). Modelos quadráticos ajustados nas análises de regressão para as espécies: *P. miniata*: $z = - 0,2663572971 + 0,0167560998x - 0,0001858807x^2 + 0,0183895898y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,6977$); *P. cristalina*: $z = - 0,2159011298 + 0,0184435253x - 0,0002192934x^2 + 0,0205444202y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,5756$); *P.*



foetida: $z = -0,0337619722 + 0,0074042658x - 0,0002543034x^2 + 0,0253501470y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,8226$)..... 31

Figura 4 – Média do número de embriões somáticos ou de brotos formados nos meios de regeneração a partir de calos provenientes do meio M1. (A) regeneração via ESI de *P. minata*; (B e C) regeneração via OI de *P. cristalina* e *P. foetida*, respectivamente. Colunas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 33

Figura 5 – Regeneração *in vitro* nas três espécies de *Passiflora*. (A – E) ESI em *P. miniata*; (F – J) OI em *P. cristalina* e (K – O) em *P. foetida*. (A, F e K) representam os explantes utilizados em cada espécie (EZI e EZM com tegumento e sem tegumento). (B – E) Embriões somáticos de *P. miniata* em diferentes estágios de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. (G – J) Brotos de *P. cristalina* e (L – O) de *P. foetida* em diferentes estágios de desenvolvimento. Escala = 1 mm. 35

Figura 6 – Média do número de embriões somáticos ou de brotos formados nos meios de regeneração (M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7) a partir de calos provenientes dos meios de indução da calogênese (M1 – M5), onde os EZM foram inoculados. (A) regeneração via ESI de *P. minata*; (B e C) regeneração via OI de *P. cristalina* e *P. foetida*, respectivamente. Colunas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 37

Figura 7 – Regeneração *in vitro* nas três espécies de *Passiflora* observadas pela MEV. (A - E) *P. miniata*; (F - J) *P. cristalina*; (K - O) *P. foetida*. (A, B, F, G e K)

superfícies dos explantes e o surgimento de calos. (C, H, I, L e M) calos com células de diferentes formas. (D) presença de matriz extracelular e embriões globulares. (E) embriões somáticos em diferentes estágios, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. (J) protuberâncias formadas a partir dos calos. (M) brotos recém-formados dos calos. (N) brotos em estágio avançado de desenvolvimento. (O) detalhe para as glândulas de resina nas folhas. A escala gráfica é representada pela barra branca na parte inferior direita de cada imagem. Legenda: Ca, calos; Co, embrião cotiledonar; Ex, explante; Em, matriz extracelular; Gl, embrião globular; He, embrião cordiforme; Pr, protuberância; Rg, glândulas de resina; Sh, brotos; To, embrião torpedo. 39

Figura 8 – Nível médio de 5-mC% dos explantes (EZI e EZM) utilizados para induzir a regeneração *in vitro* para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). 40

Figura 9 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZI e EZM em meio de indução da calogênese M1 após 35 dias para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). Em *P. foetida* não houve a formação de calos no meio M1 a partir de EZI, por isso o 5-mC% não foi determinado e não foi comparado entre os demais. 41

Figura 10 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZM após 35 dias em meios de indução da calogênese (M1 – M5) com diferentes concentrações de 2,4-D para as três espécies de *Passiflora*. Modelos



quadráticos ajustados nas análises de regressão para as espécies: *P. miniata*: $y = 37.6543 - 1.4849x + 0.0182x^2$ ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,79$) e *P. cristalina* $y = 21.6565 + 0.1054x - 0.0044x^2$ ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,79$). A média de 5-mC% para *P. foetida* ($y = 10,20$; $P = 0,25$) está representada como uma reta. 43

Figura 11 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZI e EZM em meio M1 que deram origem aos embriões somáticos em *P. miniata* ou brotos em *P. cristalina* e *P. foetida* quando transferidos para os meios de regeneração (M1, M6 e M7). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). Em *P. foetida* não houve a formação de calos e nem a formação de brotos no meio M1/M1, por isso o 5-mC% não foi determinado e não foi comparado com os demais..... 44

Figura 12 – Nível médio de 5-mC% nos meios M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7, que deram origem aos embriões somáticos em *P. miniata* (A) ou brotos em *P. cristalina* (B) e *P. foetida* (C). Colunas seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ... 46

Figura 13 – Os gráficos mostram o 5-mC% ao longo da resposta *in vitro* para as três espécies: (A) *P. minata* via ESI, (B) *P. cristalina* via OI e (C) *P. foetida* via OI. Cada trio de colunas representa como foi a metilação no explante, em seguida no calo ao final de 35 dias em cada meio de indução da calogênese e após a formação de embriões ou brotos após transferência para o meio de regeneração. Colunas em vermelho mostram o 5-mC% nos explantes utilizados para inoculação (EZI no M1 e EZM nos meios M6 e M7). As colunas em verde, o 5-mC% nos calos formados ao final de 35 dias nos diferentes meios de indução



da calogênese (M1 – M5) e as colunas em azul, o 5-mC% nos calos que deram origem a embriões somáticos ou brotos nos diferentes meios de regeneração (M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7). As médias dos 5-mC% foram comparados pelo teste de Tukey, onde colunas com letras distintas indicam diferença significativa entre os momentos da resposta *in vitro* (explante, calogênese e regeneração) ($P < 0,05$). Como supramencionado, em *P. foetida* não houve a formação de calos e nem a formação de embriões somáticos ou brotos no meio M1/M1, portanto, esta comparação não foi realizada. 47



SUMÁRIO

TÍTULO: MUDANÇAS E DIFERENÇAS EPIGENÉTICAS NA ORGANOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>PASSIFLORA</i>: INFLUÊNCIA DO EXPLANTE E DAS CONDIÇÕES <i>IN VITRO</i>.....	14
RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Material vegetal	21
Regeneração <i>in vitro</i>	22
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
Nível global de 5-metilcitosina (5-mC%).....	26
Análise estatística.....	28
RESULTADOS.....	29
Regeneração <i>in vitro</i>	29
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
Nível global de 5-metilcitosina (5-mC%).....	40
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56



TÍTULO: MUDANÇAS E DIFERENÇAS EPIGENÉTICAS NA ORGANOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *PASSIFLORA*: INFLUÊNCIA DO EXPLANTE E DAS CONDIÇÕES *IN VITRO*

Autores: Cristiana Torres Leite¹, Karina Ferreira Santos Silva², Mariana Neves Catrinck³, Elias Terra Werner¹, Wellington Ronildo Clarindo⁴, Milene Miranda Praça-Fontes¹

¹Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29.500-000 Alegre – ES, Brasil.

²Univerdidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ecologia, IB, CCS, Ilha do Fundão, 21941-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29.500-000 Alegre – ES, Brasil.

⁴Laboratório de Citogenética e Citometria, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36570900 Viçosa – MG, Brasil.

Artigo será submetido na Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)

✉ Autor de correspondência: e-mail cristianatorresleite@hotmail.com

Tel.: +55 28 99923-4712



RESUMO

O desenvolvimento de plantas *in vitro* pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles a fonte de explante, as condições de cultivo e a metilação global do DNA genômico. Sabe-se que em espécies do gênero *Passiflora* L. diferentes respostas morfogênicas são observadas sob as mesmas condições *in vitro*. Portanto, outros fatores além do cultivo *in vitro* podem influenciar na resposta, como os aspectos genéticos, fisiológicos e epigenéticos do explante. Objetivamos aqui, estabelecer o processo de morfogênese *in vitro* para três espécies do gênero *Passiflora* com a finalidade de verificar e comparar a influência dos tipos de explantes, das condições de cultivo e do nível global de 5-metilcitosina. Nossos resultados mostraram que em *Passiflora miniata* a via de regeneração foi a embriogênese somática indireta, com o maior número de embriões somáticos formados a partir de embriões zigóticos imaturos, na ausência de reguladores de crescimento e carvão ativado. Além disso, o nível global de 5-metilcitosina diminuiu na etapa de regeneração. Em *Passiflora cristalina* e *Passiflora foetida* a via morfogênica foi a organogênese indireta, sendo a maior formação de brotos desencadeada pela utilização de embriões zigóticos maduros, presença de reguladores de crescimento e carvão ativado, assim como o aumento do nível global de 5-metilcitosina na etapa de regeneração. A partir destas diferentes respostas, evidenciamos a influência do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico, do uso de reguladores de crescimento e carvão ativado e, pela primeira vez, do nível global de 5-metilcitosina ao longo do desenvolvimento *in vitro* de espécies de *Passiflora*.

Palavras-chave: cultura de tecidos vegetais, embriogênese somática indireta, epigenética, maracujá, organogênese indireta, 2,4-D.



ABSTRACT

The development of *in vitro* plants can be influenced by several factors, among them the explant source, the cultivation conditions and the global methylation of the genomic DNA. It is known that in species of *Passiflora* L. genus, different morphogenic responses are observed under the same conditions *in vitro*. Therefore, other factors may influence the response, such as the genetic, physiological and epigenetic aspects of the explant. We aim here to establish the *in vitro* morphogenesis process for three species of the genus *Passiflora* in order to verify and compare the influence of explant types, cultivation conditions and the global level of 5-methylcytosine. Our results showed that in *Passiflora miniata* the regeneration was through indirect somatic embryogenesis pathway, with the highest number of somatic embryos formed from immature zygotic embryos, in the absence of growth regulators and activated charcoal. Furthermore, the overall level of 5-methylcytosine decreased in the regeneration stage. In *Passiflora cristalina* and *Passiflora foetida*, the morphogenic pathway was indirect organogenesis, with the highest bud formation triggered by the use of mature zygotic embryos, the presence of growth regulators and activated charcoal, as well as the increase in the global level of 5-methylcytosine in the regeneration stage. From these different responses, we evidenced the influence of the developmental stage of the zygotic embryo, the use of growth regulators and activated charcoal and, for the first time, the global level of 5-methylcytosine during the *in vitro* development of *Passiflora* species.

Keywords: plant tissue culture, indirect somatic embryogenesis, epigenetics, passion fruit, indirect organogenesis, 2,4-D.



ABREVIações

ESI – Embriogênese Somática Indireta

EZI – Embrião zigótico imaturo

EZM – Embrião zigótico maduro

OI – Organogênese indireta

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

5-mC% – Nível global de 5-metilcitosina



INTRODUÇÃO

Diferentes respostas morfogênicas são observadas no gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae), sendo a maioria estabelecida via organogênese direta ou indireta (Leite et al. 2019; Mikovski et al. 2019; Silva et al. 2020; Mikovski et al. 2021). A embriogênese somática indireta (ESI) é pouco descrita e foi estabelecida apenas para espécies que possuem $2n = 18$ cromossomos (Rosa et al. 2015; Leite et al. 2019; Mikovski et al. 2019; Silva et al. 2021). Utilizando embriões zigóticos maduros de cinco espécies, Rosa et al. (2015) regeneraram plântulas via ESI para quatro espécies, as quais possuem $2n = 18$ cromossomos, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora crenata* Feuillet e Cremers, *Passiflora edulis* e *Passiflora gibertii* N. E. Brown. Nas mesmas condições *in vitro*, plântulas foram recuperadas via organogênese indireta para *Passiflora foetida* L. com $2n = 20$ cromossomos. Espécies pertencentes aos quatro subgêneros de *Passiflora* com números cromossômicos e conteúdo de DNA diferentes também apresentaram respostas morfogênicas distintas sob as mesmas condições do ambiente *in vitro* (Leite et al. 2019). Leite et al. (2019) relataram ESI para *Passiflora miniata* Vanderpl. que possui $2n = 18$ cromossomos, e organogênese indireta para *Passiflora foetida* L. que possui $2n = 20$ cromossomos. *Passiflora contracta* Vitta, *Passiflora coriacea* Juss. e *Passiflora lindeniana* TR & Planch permaneceram na fase de calos e não regeneraram plântulas (Leite et al. 2019), indicando que as condições do ambiente *in vitro* não são os únicos fatores que influenciam nas diferentes respostas observadas (Fehér 2015; Nic-Can et al. 2016; Leite et al. 2019). Os aspectos genéticos e fisiológicos do próprio explante e os aspectos epigenéticos também são importantes para induzir a morfogênese *in vitro* (Nic-Can et al. 2013; Ibrahim et al. 2015; Amaral-Silva et al. 2021; Oliveira et al. 2021).

De acordo com a teoria da totipotência de Harberlandt (1902), com o estímulo correto, os tecidos/células vegetais diferenciados reverterem ou convertem seu destino de desenvolvimento e podem se diferenciar em novos tecidos/órgãos. Porém, Campos et al. (2017) propuseram uma hipótese



alternativa, em que as células vegetais se diferenciam sem passar pelo processo de desdiferenciação. Pools de células meristemáticas, sob estímulos externos, atuam como células-tronco vegetais que podem se diferenciar. No entanto, algumas células nunca se tornarão um embrião somático independente do estímulo fornecido *in vitro*. Assim, as células responsivas são aquelas que mantêm a capacidade embriogênica (Campos et al. 2017).

Os tecidos jovens possuem um maior número de células-tronco que os tecidos envelhecidos (Campos et al. 2017). Por isso, os embriões zigóticos maduros e imaturos são considerados excelentes fontes de explantes para induzir a morfogênese *in vitro* (Ferreira et al. 2015; Satish et al. 2016; Hu et al. 2017). Os embriões zigóticos apresentam um alto nível endógeno da auxina Ácido Indolacético (AIA), mesmo quando ainda imaturos (Gaj 2004; Hu et al. 2017; Satish et al. 2016). Isso explica, por exemplo, porque algumas espécies têm a capacidade de regenerar plântulas sem o uso de reguladores de crescimento (Ferreira et al. 2015). No entanto, para a maioria dos explantes vegetais o uso de reguladores é requerido (Mikuła et al. 2015; Mikovski et al. 2019).

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas e as citocininas são comumente utilizadas na cultura de tecidos vegetais, pois podem direcionar o destino celular dos explantes e seu desenvolvimento através da via organogênica e/ou embriogênica (Fehér et al. 2003; Ozarowski e Thiem 2013; Rosa et al. 2015; Mikovski et al. 2019). Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais utilizada na etapa de indução da calogênese na cultura de tecidos (Phillips e Garda 2019). Campos et al. (2017) relataram a importância do uso de auxinas para induzir a proliferação das células totipotentes. O 2,4-D atua como um análogo exógeno de auxina e como um agente de estresse, podendo reduzir o conteúdo de auxina endógena do explante por reações de conjugação (Michalczuk et al. 1992; Jiménez 2005; Corredoira et al. 2015; Garcia et al. 2019).

Na etapa de regeneração *in vitro*, os meios de cultura são destituídos de reguladores de crescimento, visto que estes inibem o desenvolvimento de brotos ou embriões somáticos (Nissen e Minocha 1993). Nesta etapa, o carvão ativado é suplementado ao meio de cultura, em virtude da presença de um grande número de poros em sua estrutura, o que permite a adsorção de diversos compostos do meio de cultura (Pan e van Staden 1998; Thomas 2008). Como por exemplo, a adsorção de compostos fenólicos, reguladores de crescimento e outros compostos orgânicos que são indesejáveis para o desenvolvimento *in vitro* (Pan e van Staden 1998). Porém, seu uso indevido pode ser prejudicial à organogênese e/ou embriogênese, uma vez que pode ocorrer a adsorção de compostos necessários para o desenvolvimento *in vitro*, como tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido fólico e zinco (Weatherhead 1978; Johansson 1990; Pan e van Staden 1998; Ferreira et al. 2015; Leite et al. 2019).

Além das características dos explantes e das condições de cultivo *in vitro*, os aspectos epigenéticos também influenciam no processo de morfogênese (Finnegan et al. 2000; Karim et al. 2016; Schmid et al. 2018; Amaral-Silva et al. 2021; Oliveira et al. 2021). Uma das mudanças epigenéticas envolve a metilação do DNA, a qual é caracterizada pela adição de um grupo metil na posição 5' da citosina, ocasionando no aumento dos níveis de 5-metilcitosina (5-mC) no genoma das plantas (Us-Camas et al. 2014; Zhang et al 2018). Essa modificação química aumenta o nível de compactação da cromatina, influenciando nos níveis de expressão de genes envolvidos na morfogênese (Finnegan et al. 1998; Cheung e Lau 2005; Miguel e Marum 2011; Tang et al. 2020). Tal modificação é reversível e contribui para a regulação das respostas gênicas (Aceituno et al. 2008; Féher 2015; Peng e Zhang 2009; Zhang et al 2018).

Os níveis de metilação do DNA em plantas variam entre espécies, genótipos, órgãos, tecidos e até mesmo entre as células de um organismo (Arnholdt-Schmitt et al. 1995; George et al. 2008; Vanyushin e Ashapkin 2011). Além disso, evidências demonstram que as variações nos níveis de metilação do DNA são influenciadas pela exposição às diferentes condições do ambiente



in vitro durante o processo de morfogênese (Arnholdt-Schmitt et al. 1995; Miguel e Marum 2011; Smykal et al. 2007; Valledor et al. 2007; Nic-Can et al. 2015; Zhang et al. 2018). Níveis mais baixos de metilação do DNA provavelmente estão relacionados ao processo de desdiferenciação das células (Grzybkowska et al. 2018; Elhiti et al. 2010). Por outro lado, níveis elevados de metilação do DNA podem estar relacionados ao processo de regeneração de embriões somáticos (Chakrabarty et al. 2003). Portanto, a metilação do DNA pode ser crucial para o crescimento e desenvolvimento dos embriões somáticos, assim como para as respostas ao estresse promovido pelo ambiente *in vitro* (Zhang et al. 2018). Essas variações podem agilizar o processo de desenvolvimento, principalmente para espécies as quais a regeneração *in vitro* ainda não foi obtida (Zhang et al. 2018).

Em *Passiflora*, a metilação do DNA ainda não foi abordada durante a morfogênese *in vitro* e isso pode ser um elemento chave para compreensão deste processo. Assim, nós pretendemos estabelecer o processo de morfogênese *in vitro* para três espécies de *Passiflora* e a partir disto verificar e comparar a influência dos tipos de explantes, das condições de cultivo *in vitro* e do nível de 5-metilcitosina global do DNA ao longo deste processo nas diferentes espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As espécies *Passiflora miniata* Vanderpl., *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi e *Passiflora foetida* L. foram selecionadas por apresentarem diferentes respostas morfogênicas sob as mesmas condições *in vitro* (Rosa e Dornelas 2012; Ferreira et al. 2015; Rosa et al. 2015; Leite et al. 2019). Além disso, essas espécies do gênero *Passiflora* apresentam diferentes números cromossômicos e/ou conteúdo de DNA nuclear 2C. *P. miniata* (VIES 34972) possui $2n = 18$

cromossomos e $2C = 3,40$ pg, *P. cristalina* (VIES 34967) apresenta $2n = 18$ e $2C = 3,11$ e *P. foetida* (VIES 34979) possui $2n = 20$ cromossomos e $2C = 1,04$ pg. Os frutos de *P. miniata* e *P. cristalina* foram coletados em um fragmento da Floresta Amazônica localizado no município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil (lat: -9.958056 long: -55.832222 WGS84), e os frutos de *P. foetida* foram coletados na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil (lat: -20.763611 long: -41.533056 WGS84).

Regeneração *in vitro*

Embriões zigóticos imaturos (EZI) e maduros (EZM) foram excisados das sementes e desinfestados (Figura 1). A desinfestação foi realizada em câmara de fluxo laminar seguindo três etapas: imersão em etanol 70% por 1 min, imersão em hipoclorito de sódio 2,5% adicionado com Tween 20[®] 0,1% por 20 min, seguida de quatro lavagens em água tipo I esterilizada. Os explantes foram inoculados em placas de Petri de 60 x 15 mm contendo 15 mL do meio de indução de calos (Ferreira et al. 2015; Leite et al. 2019). Os meios consistiram de $4,3$ g L⁻¹ de sais MS (Sigma[®]) (Murashige e Skoog 1962), 10 mL L⁻¹ de vitamina B5 (Sigma[®]) (Gamborg et al. 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose (Sigma[®]) e $2,8$ g L⁻¹ de Phytigel (Sigma[®]). O meio M1 não foi suplementado com reguladores de crescimento. Os demais meios foram suplementados com $4,44$ μM 6-benzilaminopurina (BAP) e diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): $9,06$ μM (M2), $18,12$ μM (M3), $36,24$ μM (M4) e $72,48$ μM (M5) (Figura 1). O pH dos meios foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

EZI e EZM foram inoculados no meio M1, que não contém reguladores de crescimento. Nos demais meios suplementados com BAP e com diferentes concentrações de 2,4-D (M2 – M5), apenas os EZM foram inoculados. Segundo Ferreira et al. (2015), os EZI possivelmente possuem níveis de hormônios



endógenos suficientes para induzir a embriogênese somática indireta na ausência de reguladores de crescimento. Estes autores observaram as maiores taxas de embriões somáticos no meio sem adição de reguladores. Cinco explantes foram inoculados em cada placa de Petri, sendo 20 placas para cada meio e para cada espécie, totalizando 600 explantes por espécie. As placas de Petri do meio M1 foram mantidas no fotoperíodo (16 h luz/8 h escuro) visto a ausência de reguladores de crescimento, e as demais foram mantidas no escuro, ambas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 35 dias (Ferreira et al. 2015). A formação de calos foi avaliada semanalmente até 35 dias.

Para comparar a taxa de formação de calos entre os explantes (EZI e EZM) no meio M1, nós conduzimos o experimento em fatorial $3 \times 2 \times 5$, considerando os fatores: espécie (*P. cristalina*, *P. foetida* e *P. miniata*), explante (EZI e EZM) e tempo de exposição (7, 14, 21, 28 e 35 dias). Um fatorial $3 \times 5 \times 5$ foi empregado para comparar a taxa de formação de calos a partir dos EZM, considerando os fatores: espécie (*P. cristalina*, *P. foetida* e *P. miniata*), concentração de 2,4-D (0 μM , 9,06 μM , 18,12 μM , 36,24 μM e 72,48 μM) e tempo de exposição (7, 14, 21, 28 e 35 dias).

Os calos friáveis das três espécies, gerados a partir dos EZI e EZM nos meios M1 – M5, foram transferidos aleatoriamente para os meios de regeneração, denominados M1, M6 (Rosa e Dornelas 2012) e M7 (Silva et al. 2009) (Figura 1). O M6 foi consistindo de 2,15 g L⁻¹ de sais MS (Sigma®) (Murashige e Skoog 1962), 5 mL L⁻¹ de vitamina B5 (Sigma®) (Gamborg et al. 1968), 15 g L⁻¹ de sacarose (Sigma®), 2,8 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma®). O M7 conteve 4,3 g L⁻¹ de sais MS (Sigma®) (Murashige e Skoog 1962), 10 mL L⁻¹ de vitamina B5 (Sigma®) (Gamborg et al. 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose (Sigma®), 30 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma®) e 2,8 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma®). Os calos provenientes dos EZI foram mantidos nas mesmas condições do meio M1 para induzir a regeneração (Ferreira et al. 2015) e foram denominados de M1/M1 (Figura 1). Os calos provenientes dos EZM inoculados nos meios M1 – M5 foram transferidos para os meios M6 e M7, onde foram denominados de M1/M6,



M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7 (Figura 1). Dois calos foram inoculados em cada placa de Petri, sendo 10 placas para cada meio e para cada espécie. As culturas foram submetidas às condições de fotoperíodo (16 h luz/8 h escuro) e mantidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os embriões somáticos ou os brotos formados foram transferidos para o meio M1 e mantidos em fotoperíodo (16 h luz/8 h escuro) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, a fim de completarem o seu desenvolvimento (Ferreira et al. 2015).

A taxa de regeneração foi comparada a partir do número de embriões somáticos ou de brotos regenerados em M1/M1 para os EZI, e M1/M6 e M1/M7 para os EZM. As mesmas variáveis foram avaliadas para os calos gerados nos meios M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7, onde os EZM foram inoculados.

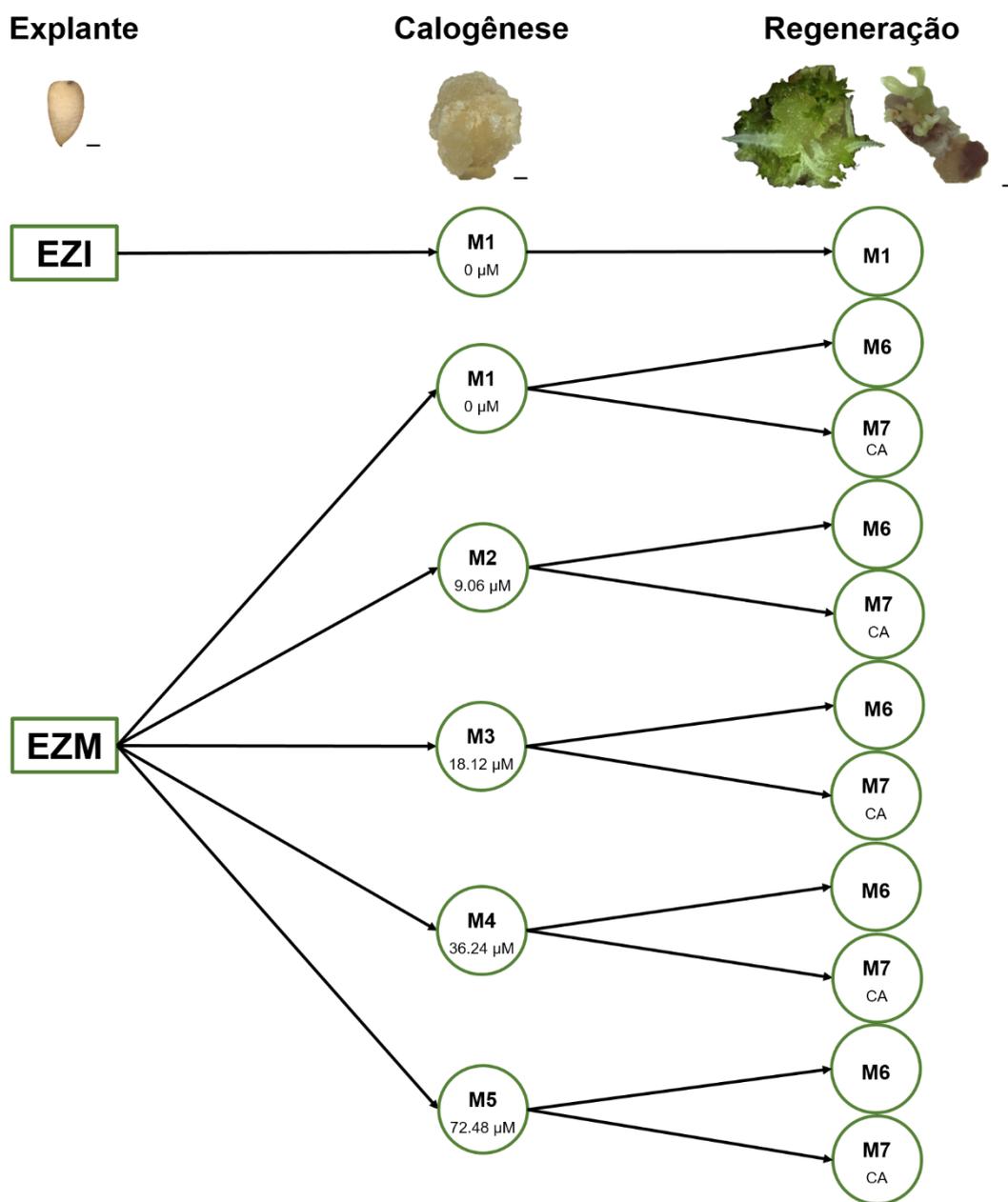


Figura 1 - Desenho experimental das diferentes etapas de indução da regeneração *in vitro*. EZI e EZM foram usados como explantes. A etapa de calogênese foi conduzida com os meios de indução (M1, M2, M3, M4 e M5) contendo as diferentes concentrações de 2,4-D. A etapa de regeneração foi conduzida com diferentes meios (M1, M6 e M7) nos quais os calos friáveis foram inoculados. Legenda: CA, carvão ativado; EZI, embrião zigótico imaturo; EZM, embrião zigótico maduro. Escala = 1 mm.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de evidenciar e confirmar as estruturas nos diferentes momentos da resposta *in vitro*, amostras foram coletadas dos explantes, dos calos formados na etapa de indução da calogênese e dos embriões somáticos ou brotos formados na etapa de regeneração para as três espécies de *Passiflora*. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (Glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em 0,1 mol L⁻¹ de solução tamponada - PBS pH 7,2) (Karnovsky 1965) e armazenadas em geladeira a 4 °C. Em seguida, a pós-fixação foi realizada em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e tetróxido de ósmio 1% por 60 min em temperatura ambiente. Pós-fixação, as amostras foram desidratadas por uma série gradativa de etanol, sendo 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Após esta etapa, as amostras foram secas no ponto crítico de CO₂ (Autosandri-815, Tousimis®) e fixadas nos stubs e pulverizadas com ouro (20 nm) em um metalizador (Desk V, DentonVaccum®). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo Jeol, JEM6610 LV®), operado com filamento de tungstênio a 20Kv.

Nível global de 5-metilcitosina (5-mC%)

Para mensurar o percentual de 5-mC (5-mC%) ao longo da resposta *in vitro* foram coletadas amostras de EZI e EZM, calos friáveis em meio de indução (M1 – M5) aos 35 dias, e calos em meio de regeneração (M1, M6 e M7) que geraram embriões somáticos ou brotos (Figura 1). A extração do DNA genômico das amostras foi conduzido de acordo com Doyle e Doyle (1990). A concentração e pureza do DNA genômico foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Thermo Scientific®) e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

As bases nitrogenadas do DNA foram hidrolisadas a partir do protocolo de hidrólise ácida descrito por Demeulemeester et al. (1999). Em uma solução de 100 µL de água tipo I contendo 30 µg de DNA, 50 µL de ácido perclórico 70%

(HClO₄) foram adicionados. A solução foi aquecida a 100 °C por 60 min. Após a hidrólise, o pH das amostras foi ajustado entre 3 e 5 com hidróxido de potássio (KOH 1,0 mol L⁻¹). O precipitado branco de perclorato de potássio (KClO₄) foi formado. Com o pH ajustado, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, e em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Ao precipitado, 200 µL de água tipo I foram adicionados, agitado em vórtex por 10 s e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. Esse processo foi repetido duas vezes. Em seguida, os tubos contendo as amostras do DNA hidrolisado foram colocados no concentrador de amostras a vácuo (Concentrator Plus - Eppendorf®) para evaporar todo o solvente. Após evaporação do solvente, as bases nitrogenadas do DNA genômico foram redissolvidas em 100 µL de água tipo I e as análises cromatográficas foram realizadas em aparelho HPLC Prominence (Shimadzu®, modelo LC-20AT) equipado com detector de matriz de fotodíodos (Shimadzu®, SPD-M20A). Os analitos foram separados em uma coluna Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula; Phenomenex®). A fase móvel utilizada foi uma solução de fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂ HPO₄ 50 mmol L⁻¹, pH 7) com vazão de 0,7 mL min⁻¹. A citosina e a 5-metilcitosina foram monitoradas a um comprimento de onda de 270 nm. Os picos de citosina e 5-metilcitosina foram identificados por comparação com padrões analíticos. O nível de metilação global foi mensurado de acordo com a equação 1:

$$(\%)5mC = \frac{A_{5mC}}{A_{5mC} + A_C} \times 100$$

Equação 1

Onde, A_{5mC} é a área que se refere ao pico de 5-metilcitosina e A_C , a área referente ao pico de citosina.

Para comparar o 5-mC% entres os explantes utilizados para a inoculação, nós estruturamos um esquema fatorial 3 x 2, considerando espécie (*P. miniata*, *P. cristalina* e *P. foetida*) e explante (EZI e EZM). O fatorial 3 x 2 também foi utilizado para comparar o 5-mC% dos calos, na etapa de indução da calogênese, após 35 dias em meio M1. Também durante a calogênese, o esquema fatorial 3

x 5 foi empregado para comparar o 5-mC% dos calos a partir dos EZM nos meios M1 – M5, considerando: espécie (*P. cristalina*, *P. foetida* e *P. miniata*) e concentração de 2,4-D (0 μ M, 9,06 μ M, 18,12 μ M, 36,24 μ M e 72,48 μ M).

Na etapa de regeneração, foram avaliados em um esquema fatorial 3 x 3, o 5-mC% obtido partir do DNA genômico dos calos que regeneraram embriões somáticos ou brotos nos meios M1/M1, M1/M6 e M1/M7 considerando espécie (*P. miniata*, *P. cristalina* e *P. foetida*) e meio de regeneração (M1, M6 e M7). Os valores de 5-mC% também foram avaliados nos calos que originaram embriões somáticos ou brotos nos meios M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7, para cada espécie.

A fim de compreender as variações nos níveis de 5-metilcitosina global do DNA ao longo de toda a resposta *in vitro* de cada espécie, os 5-mC% foram comparados nas três diferentes etapas supramencionadas. As etapas nos diferentes meios foram comparadas pelo teste de Tukey.

Análise estatística

A normalidade dos dados dos experimentos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para os experimentos em esquema fatorial, o teste de médias de Tukey sobre os fatores qualitativos ($P < 0,05$) foi aplicado quando detectada significância nas interações ou nos fatores. Para os fatores quantitativos uma análise de regressão foi realizada, sendo representada apenas com base na significância da regressão ($P < 0,05$), coeficiente de determinação (R^2) e fenômeno biológico em estudo. O teste de Tukey também foi utilizado nas comparações diretas ($P < 0,05$). As análises foram realizadas no software R (R Development Core Team 2020), utilizando o pacote vegan (Oksanen et al. 2017).

RESULTADOS

Regeneração *in vitro*

Calos com aspecto friável de coloração amarelo pálido foram observados na superfície dos explantes das três espécies ao longo dos 35 dias. Os primeiros calos nos EZI apareceram aos 28 dias para *P. cristalina* e 35 dias para *P. miniata*. Já nos EZM, os calos surgiram aos 21 dias para *P. miniata* e *P. cristalina*, e aos 28 dias para *P. foetida* (Figura 2). Espécie e o tipo de explante interferiram no número médio de calos gerados no meio M1 sem adição de reguladores de crescimento, não havendo influência do tempo. Quando comparada a *P. miniata* e *P. foetida*, *P. cristalina* apresentou a maior média de calos, com 0,46 nos EZI. Nos EZM as médias não diferiram entre as espécies (Figura 2).

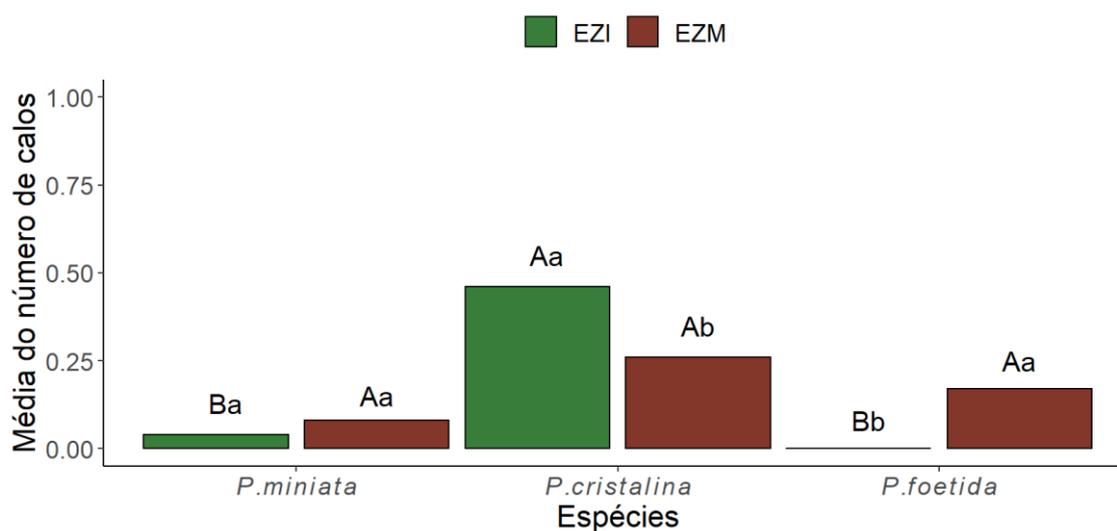


Figura 2 - Média do número de calos formados ao final de 35 dias a partir dos EZI e EZM inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento (M1) para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada tipo de explante, e com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$).



Espécie, concentração de 2,4-D (M1 – M5) e tempo interferiram no número médio de calos gerados a partir dos EZM. A média do número de calos aumentou gradualmente ao longo do tempo e com o aumento das concentrações de 2,4-D nas três espécies (Figura 3). Os primeiros calos em *P. miniata* e *P. cristalina* foram observados aos 21 dias no meio M1 e aos 14 dias nos demais meios (Figuras 3A, B). Calos de *P. foetida* foram observados aos 28 dias no M1 e aos 7 dias nos demais meios de cultura (Figura 3C). A maior porcentagem de calos formados aos 35 dias foi observada no meio M5 para as três espécies, onde 86% dos explantes inoculados formaram calos para *P. miniata* e 100% formaram calos para *P. cristalina* e *P. foetida* (Figura 3).

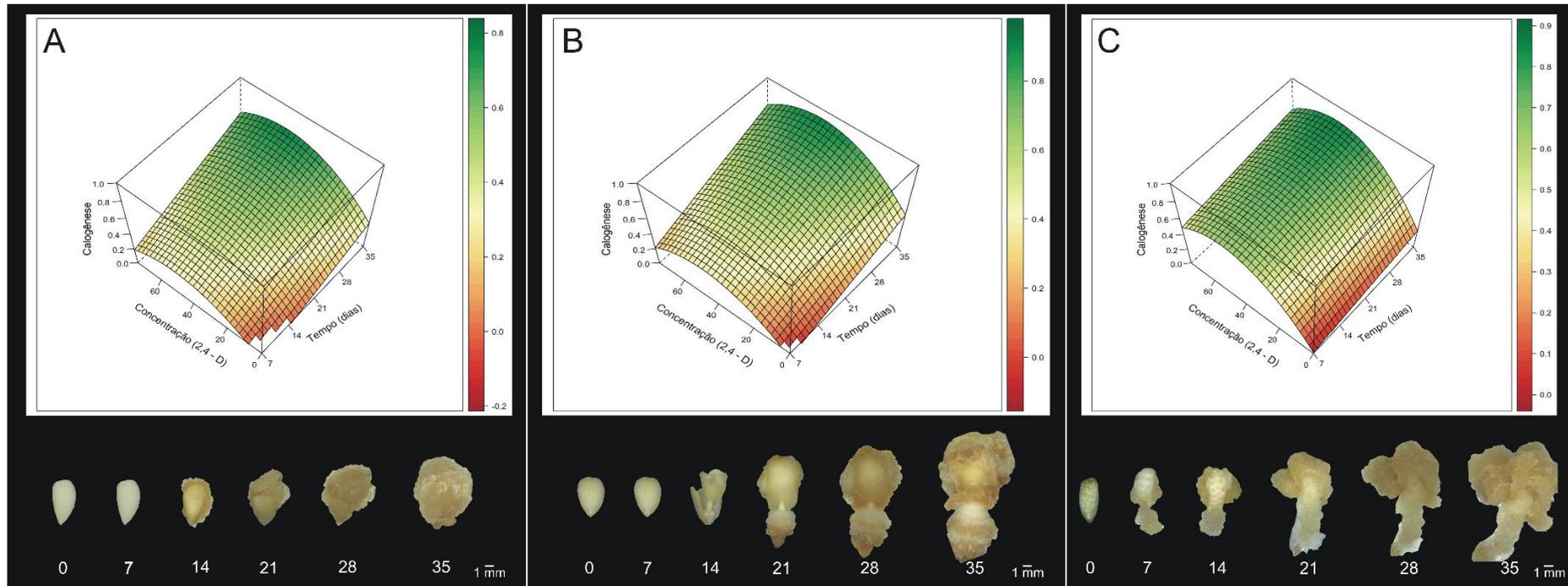


Figura 3 – Gráficos de superfície de resposta mostrando a influência do tempo em dias (x) e da concentração de 2,4-D μM (y) na média de calos friáveis (z) formados a partir dos EZM das três espécies inoculadas em meio de indução de calogênese (M1 – M5) ($P < 0,05$). (A) *P. miniata*. (B) *P. cristalina*. (C) *P. foetida*. Abaixo de cada gráfico, os calos de cada espécie no meio M5 estão representados nos diferentes dias de avaliação (0; 7; 14; 21; 28; 35 dias). Modelos quadráticos ajustados nas análises de regressão para as espécies: *P. miniata*: $z = -0,2663572971 + 0,0167560998x - 0,0001858807x^2 + 0,0183895898y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,6977$); *P. cristalina*: $z = -0,2159011298 + 0,0184435253x - 0,0002192934x^2 + 0,0205444202y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,5756$); *P. foetida*: $z = -0,0337619722 + 0,0074042658x - 0,0002543034x^2 + 0,0253501470y$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,8226$).



Diferentes respostas morfogênicas foram observadas nos meios de regeneração (M1, M6 e M7) a partir dos calos provenientes dos EZI e EZM dos meios de indução da calogênese (M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7). Embriões somáticos de *P. miniata* foram regenerados via embriogênese somática indireta, e brotos de *P. cristalina* e *P. foetida* via organogênese indireta (Figuras 4 – 7).

A maior média de embriões somáticos de *P. miniata* foi observada no meio M1/M1, com 5,4 embriões por calo, diferindo dos meios M1/M6 e M1/M7. No meio M7 contendo carvão ativado, não ocorreu a formação de embriões somáticos (Figura 4A). Brotos de *P. cristalina* foram formados nos três meios de regeneração a partir dos calos provenientes do meio M1, com médias estatisticamente iguais (Figura 4B). Calos não foram formados no meio M1/M1 de *P. foetida*, portanto, brotos ou embriões somáticos também não. Nos meios M1/M6 ou M1/M7, o número médio de brotos formados foi estatisticamente igual para *P. foetida* (Figura 4C).

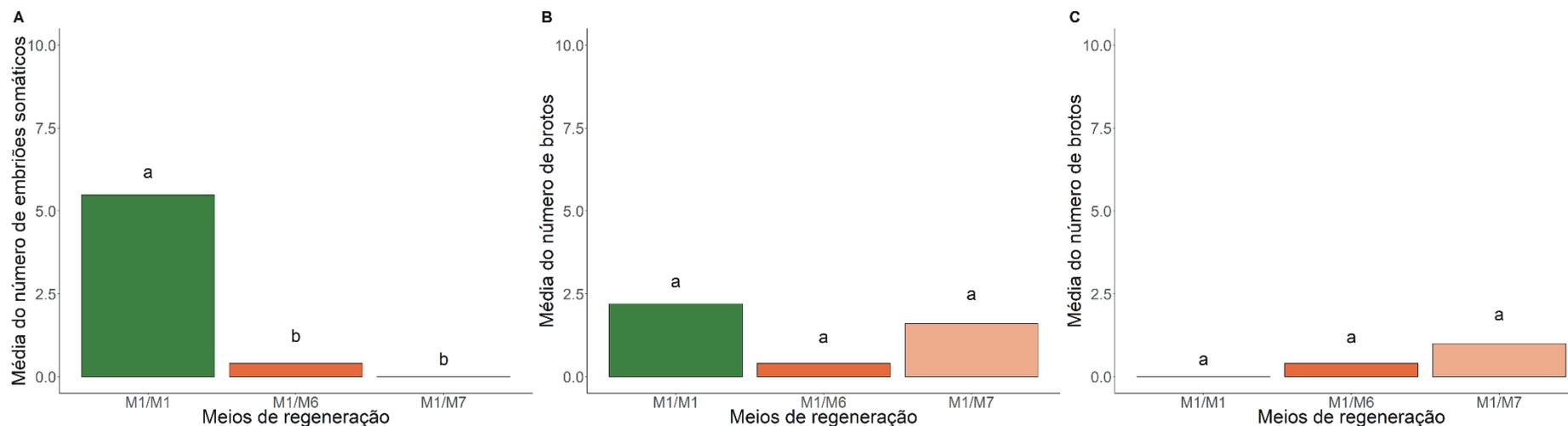


Figura 4 – Média do número de embriões somáticos ou de brotos formados nos meios de regeneração a partir de calos provenientes do meio M1. (A) regeneração via ESI de *P. minata*; (B e C) regeneração via OI de *P. cristalina* e *P. foetida*, respectivamente. Colunas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



Os primeiros embriões somáticos foram regenerados após 56 dias, apresentando diferentes estágios de desenvolvimento, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, confirmando a resposta assíncrona da ESI em *P. miniata* (Figuras 5B – E). Os embriões somáticos foram regenerados apenas quando os calos foram transferidos para o meio M6 (M1/M6, M2/M6, M3/M6, M4/M6 e M5/M6) (Figura 6A). A maior média foi no meio M3/M6, com 3,3 embriões por calo. No meio M7, embriões somáticos não foram regenerados independente da concentração de 2,4-D ao qual os calos foram formados (Figura 6A).

Em *P. cristalina*, os primeiros sinais de formação de brotos ocorreram após 14 dias nos meios de regeneração (Figura 5G – J). As maiores médias de brotos foram observadas nos meios M5/M7 e M3/M7, com média de 9,9 e 7,2 brotos por calo, respectivamente (Figura 6B). A menor média foi no meio M1/M6, com 0,4 brotos por calo (Figura 6B). Para *P. foetida*, as estruturas organogênicas regeneraram na superfície dos calos com apenas 7 dias (Figura 5L – O). (Figura 6C). A maior média de brotos ocorreu no meio M4/M7, com 8,2 brotos por calo e a menor média no M1/M6, com 0,4 brotos por calo (Figura 6C).

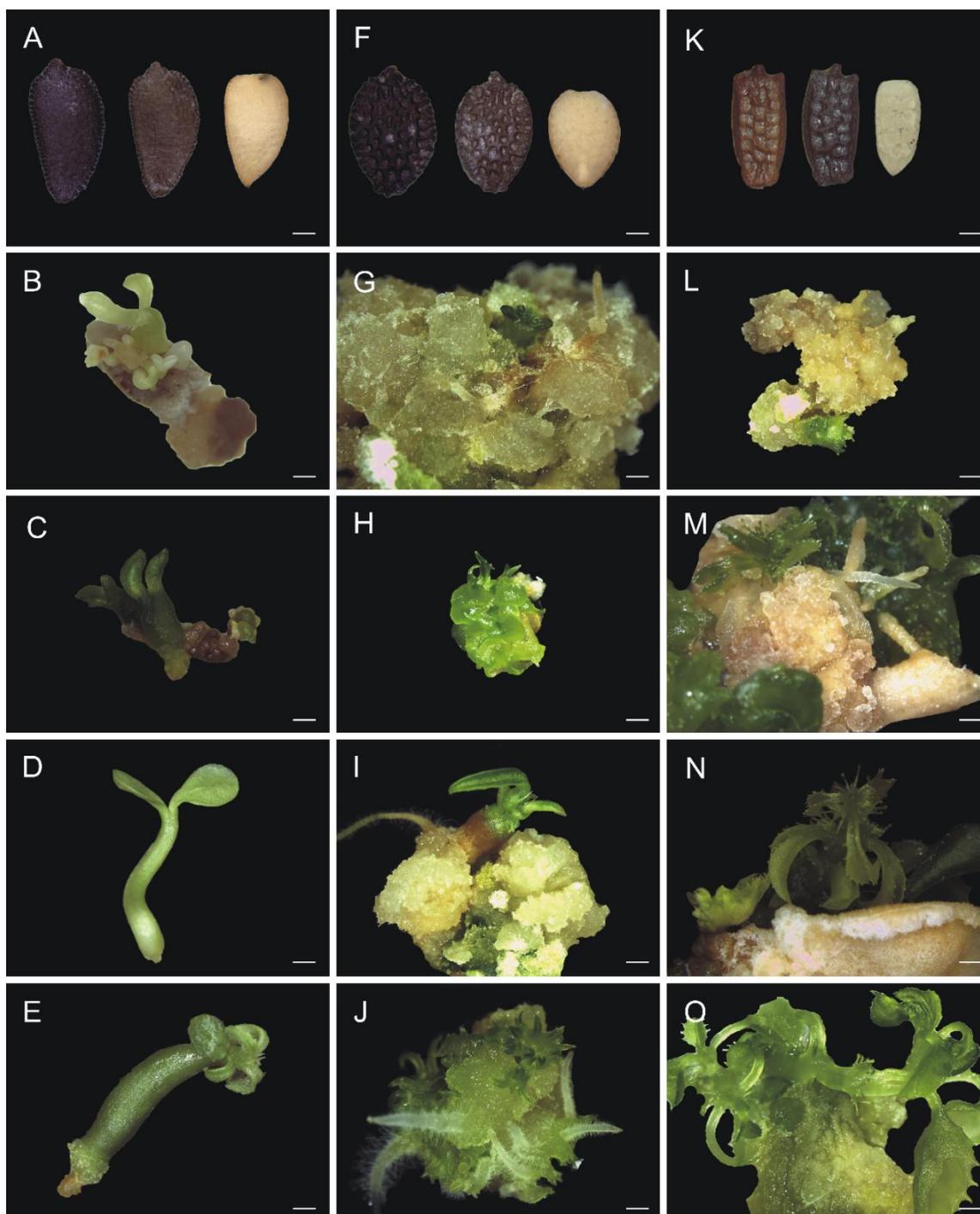


Figura 5 – Regeneração *in vitro* nas três espécies de *Passiflora*. (A – E) ESI em *P. miniata*; (F – J) OI em *P. cristalina* e (K – O) em *P. foetida*. (A, F e K) representam os explantes utilizados em cada espécie (EZI e EZM com tegumento e sem tegumento). (B – E) Embriões somáticos de *P. miniata* em diferentes estágios de desenvolvimento:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO – PPGGM



globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. (G – J) Brotos de *P. cristalina* e (L – O) de *P. foetida* em diferentes estágios de desenvolvimento. Escala = 1 mm.

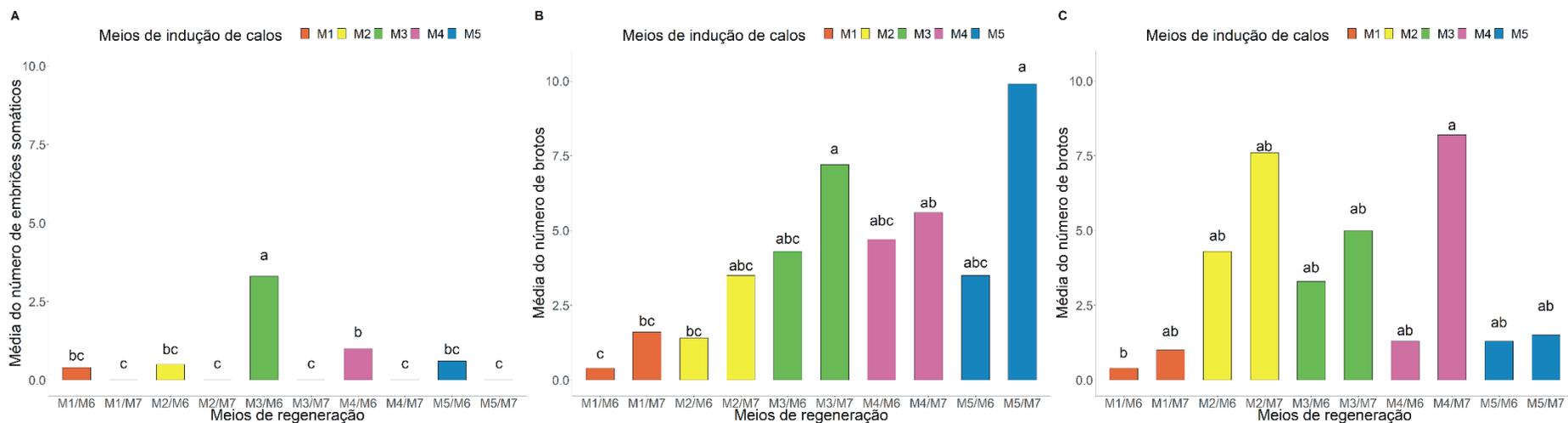


Figura 6 – Média do número de embriões somáticos ou de brotos formados nos meios de regeneração (M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7) a partir de calos provenientes dos meios de indução da calogênese (M1 – M5), onde os EZM foram inoculados. (A) regeneração via ESI de *P. minata*; (B e C) regeneração via OI de *P. cristalina* e *P. foetida*, respectivamente. Colunas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As diferentes etapas da resposta *in vitro* (explante, calogênese e regeneração) para as três espécies de *Passiflora* foram observadas com maior resolução nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O surgimento de calos foi evidente na superfície dos explantes das três espécies de *Passiflora*, sendo possível notar uma variedade de formas de células calosas, como células isodiamétricas, oblíquas e alongadas (Figuras 7C, 7H, 7I, 7L e 7M). Além disso, foi verificada a presença de matriz extracelular na superfície dos calos, como uma estrutura de manto onde brotos ou embriões são formados posteriormente (Figura 7D).

Em *P. miniata*, calos embriogênicos que se desenvolveram em embriões somáticos foram observados com detalhes. No mesmo explante, ficou evidente a formação dos diferentes estágios de desenvolvimento do embrião somático, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, confirmando a resposta assíncrona durante a ESI (Figura 7E). A formação de brotos a partir das células calosas de *P. cristalina* e de *P. foetida* também foi observada com detalhes (Figura 7J, 7M, 7N, 7O). Nas plântulas em estágio avançado de desenvolvimento de *P. foetida*, fica evidente a presença de glândulas de resina nos folíolos, semelhantes ao observado nas plantas no ambiente *ex vitro* (Figuras 7N e 7O).

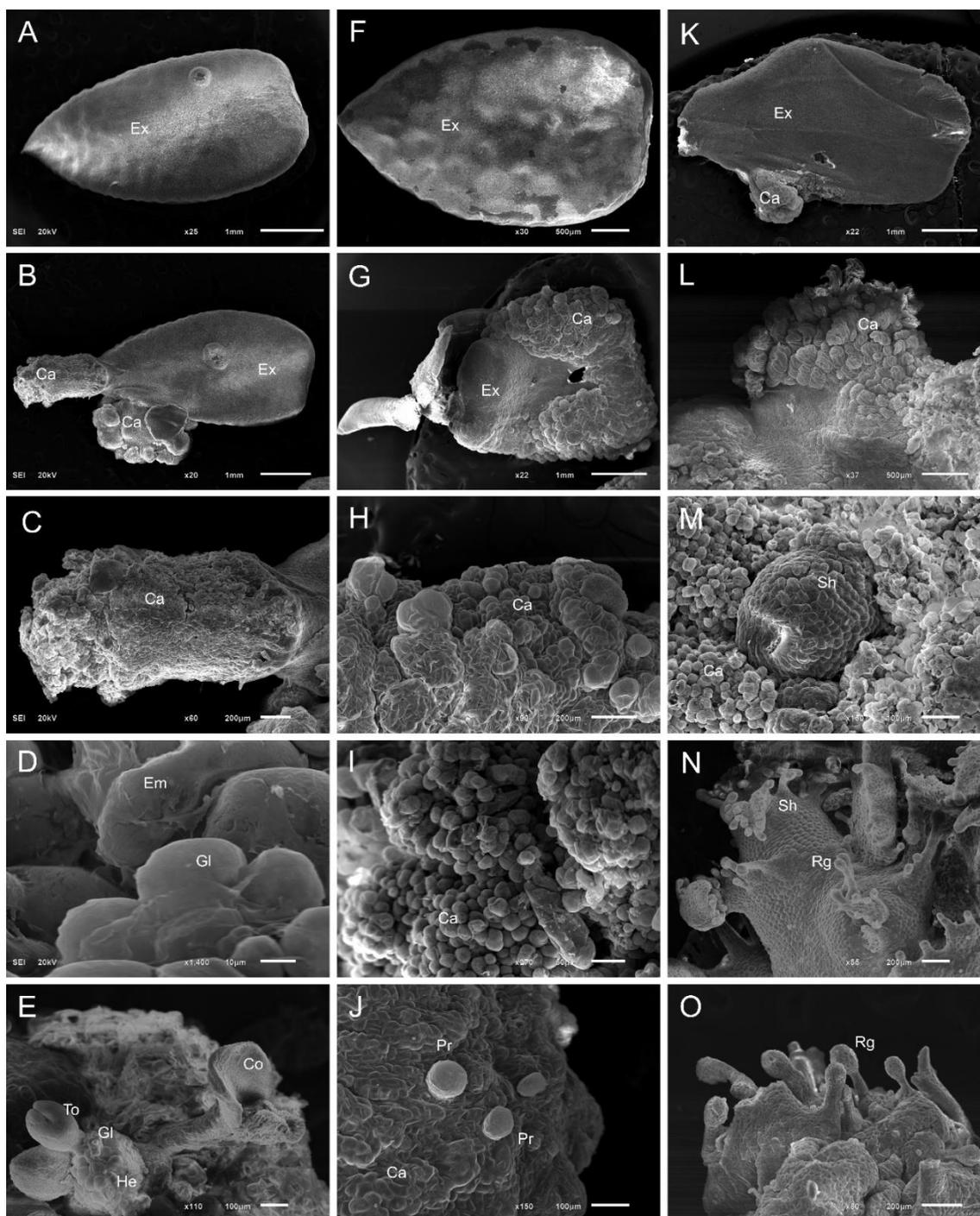


Figura 7 – Regeneração *in vitro* nas três espécies de *Passiflora* observadas pela MEV. (A - E) *P. miniata*; (F - J) *P. cristalina*; (K - O) *P. foetida*. (A, B, F, G e K) superfícies dos explantes e o surgimento de calos. (C, H, I, L e M) calos com células de diferentes formas. (D) presença de matriz extracelular e embriões globulares. (E) embriões somáticos em diferentes estágios, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. (J)

protuberâncias formadas a partir dos calos. (M) brotos recém-formados dos calos. (N) brotos em estágio avançado de desenvolvimento. (O) detalhe para as glândulas de resina nas folhas. A escala gráfica é representada pela barra branca na parte inferior direita de cada imagem. Legenda: Ca, calos; Co, embrião cotiledonar; Ex, explante; Em, matriz extracelular; Gl, embrião globular; He, embrião cordiforme; Pr, protuberância; Rg, glândulas de resina; Sh, brotos; To, embrião torpedo.

Nível global de 5-metilcitosina (5-mC%)

Nós mensuramos, pela primeira vez, os níveis globais de 5-mC% ao longo da resposta *in vitro* para as três espécies de *Passiflora*, desde os explantes, a etapa de indução da calogênese até a etapa de regeneração. Os 5-mC% dos EZI de *P. miniata* e *P. cristalina* foram estatisticamente iguais e superiores em relação à *P. foetida* (Figura 8). O 5-mC% diferiu entre os EZM das três espécies, sendo a maior média para *P. cristalina* com 33,48% e a menor para *P. foetida* com 17,01%. Entre os explantes de *P. miniata* e *P. foetida*, o 5-mC% dos EZI foram superiores aos EZM. Em *P. cristalina* o contrário foi observado (Figura 8).

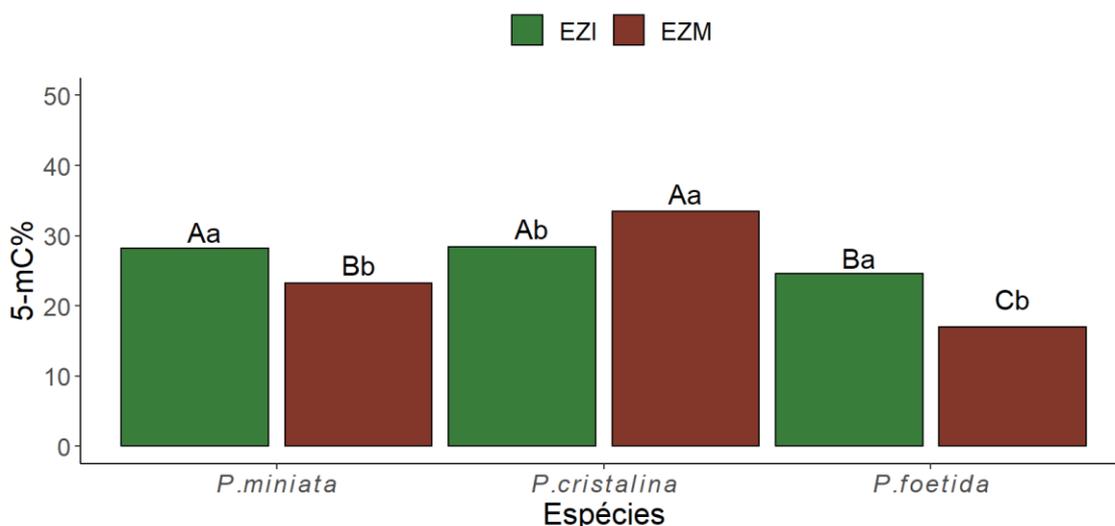


Figura 8 – Nível médio de 5-mC% dos explantes (EZI e EZM) utilizados para induzir a regeneração *in vitro* para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas

pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$).

Na indução da calogênese, *P. miniata* apresentou a maior média dos 5-mC%, para os dois explantes, com 33,96% nos EZI e 43,40% nos EZM. O menor 5-mC% foi observado nos EZM de *P. foetida* com 5,65%. Em *P. miniata* o 5-mC% nos EZM foram superiores aos EZI e em *P. cristalina* o contrário foi observado (Figura 9). Este resultado na indução de calos foi inverso ao observado na avaliação da 5-mC% nos explantes utilizados para inoculação (Figura 8). Não houve formação de calos nos EZI de *P. foetida*, portanto, estes não foram comparados com os EZM (Figura 9).

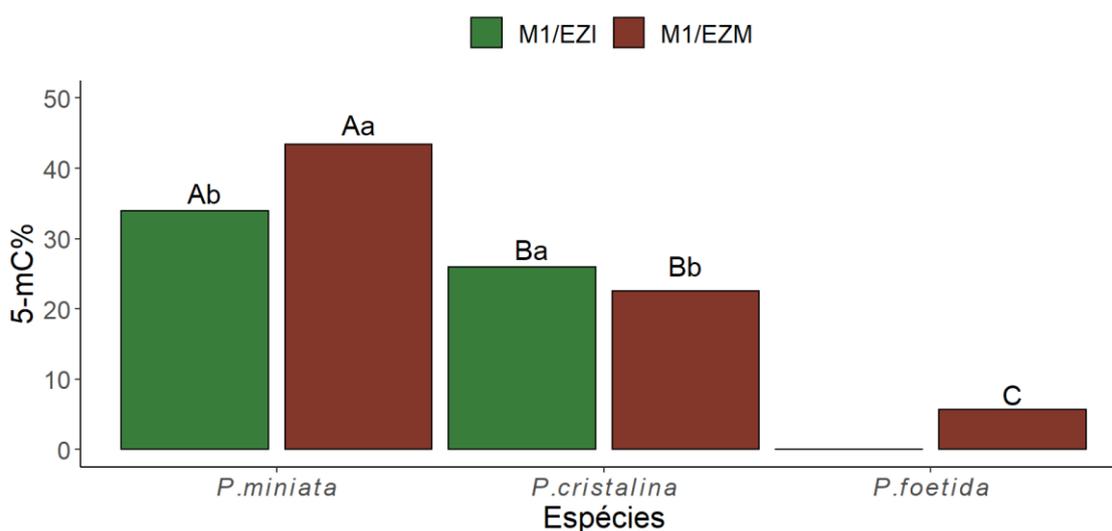


Figura 9 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZI e EZM em meio de indução da calogênese M1 após 35 dias para as três espécies de *Passiflora*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). Em *P. foetida* não houve a formação de



calos no meio M1 a partir de EZI, por isso o 5-mC% não foi determinado e não foi comparado entre os demais.

Espécie e concentração de 2,4-D influenciaram no 5-mC% dos calos provenientes dos EZM após 35 dias em meios de indução da calogênese (Figura 10). *P. miniata* e *P. cristalina* tiveram o modelo de regressão polinomial quadrática significativo. Para *P. miniata*, verificamos o maior 5-mC% no meio sem adição de reguladores de crescimento (M1), com média de 43,40%, decaindo com a elevação das concentrações de 2,4-D nos meios contendo 18,12 μM (M3) e 36,24 μM (M4), com 11,74% e 14,06%, respectivamente, e retomando uma elevação do 5-mC% no meio com 72,48 μM (M5). Em *P. cristalina* houve um aumento do 5-mC% no meio contendo 9,06 μM (M2), que posteriormente decaiu com a elevação das concentrações de 2,4-D. Em *P. foetida* não houve variação significativa do 5-mC% dos calos formados nos meios (M1 – M5) com as diferentes concentrações de 2,4-D.

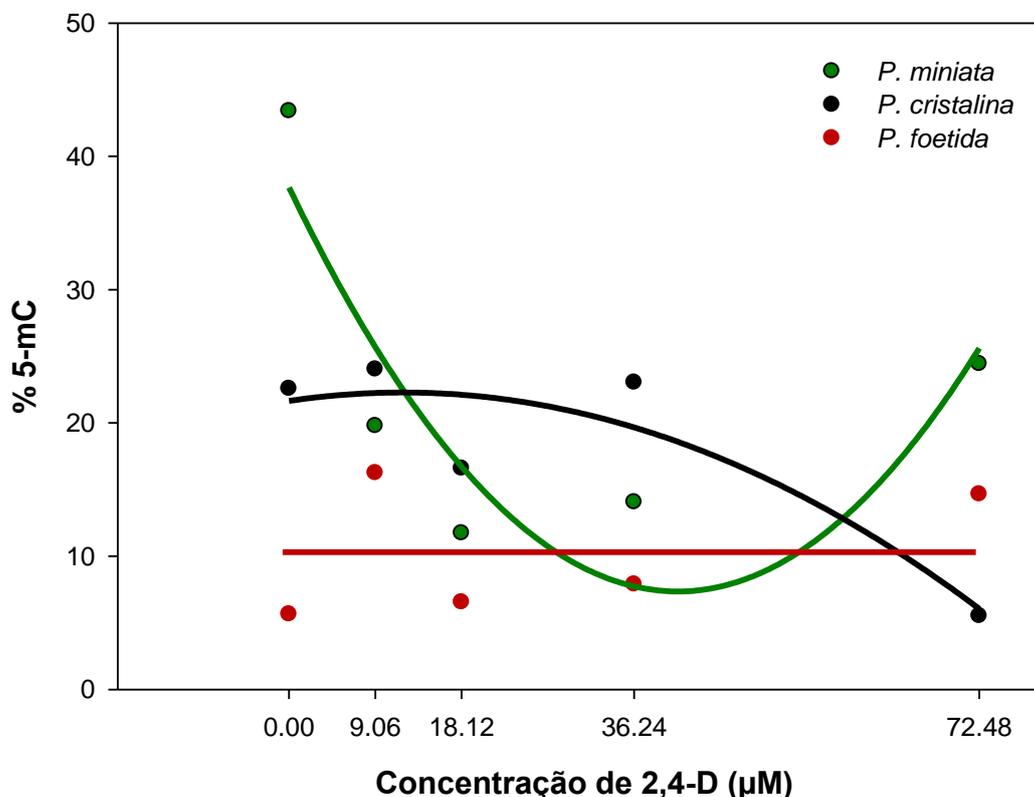


Figura 10 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZM após 35 dias em meios de indução da calogênese (M1 – M5) com diferentes concentrações de 2,4-D para as três espécies de *Passiflora*. Modelos quadráticos ajustados nas análises de regressão para as espécies: *P. miniata*: $y = 37.6543 - 1.4849x + 0.0182x^2$ ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,79$) e *P. cristalina* $y = 21.6565 + 0.1054x - 0.0044x^2$ ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,79$). A média de 5-mC% para *P. foetida* ($y = 10,20$; $P = 0,25$) está representada como uma reta.

Os maiores valores de 5-mC% foram observados em *P. cristalina* nos três meios de regeneração (Figura 11). *P. miniata* e *P. cristalina* apresentaram o maior 5-mC% no meio M1/M7 com 22,79% e 29,33% e o menor no meio M1/M6, com 13,38% e 22,39%, respectivamente. Em *P. foetida*, o maior 5-mC% foi verificado no meio M1/M6, com 15,63% e o menor no M1/M7 com 12,76%.

Devido à ausência de brotos no M1/M1, somente os meios M1/M6 e M1/M7 foram comparados nesta espécie.

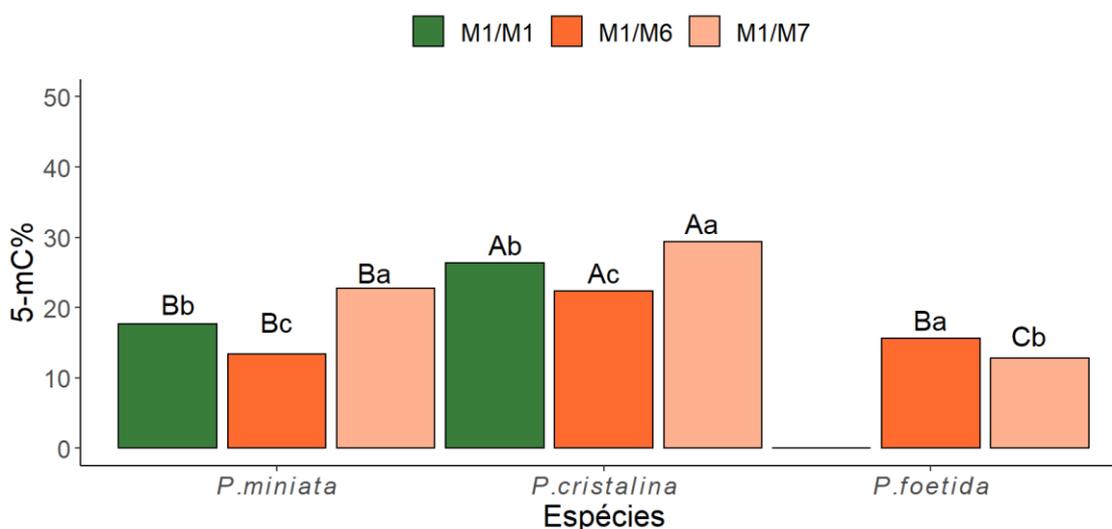


Figura 11 – Nível médio de 5-mC% dos calos provenientes dos explantes EZI e EZM em meio M1 que deram origem aos embriões somáticos em *P. miniata* ou brotos em *P. cristalina* e *P. foetida* quando transferidos para os meios de regeneração (M1, M6 e M7). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, onde colunas com letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as espécies dentro de cada nível de explante e com letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os explantes dentro de cada espécie ($P < 0,05$). Em *P. foetida* não houve a formação de calos e nem a formação de brotos no meio M1/M1, por isso o 5-mC% não foi determinado e não foi comparado com os demais.

Os 5-mC% dos calos que originaram embriões somáticos ou brotos, diferiram entre os meios de regeneração (M6 e M7) provenientes das diferentes concentrações de 2,4-D em cada espécie (Figura 12). *P. miniata* apresentou os maiores 5-mC% no meio M7 para todas as concentrações de 2,4-D. Sendo a maior média no meio M3/M7, com 33,25% (Figura 12A). *P. cristalina* e *P. foetida* apresentaram os maiores 5-mC% no meio M6 (exceto para o M1/M6 em *P. cristalina*) para todas as concentrações de 2,4-D (Figura 12B e 12C). As maiores



médias para *P. cristalina* foram nos meios M4/M6 (42,24%) e M5/M6 (48,17%) e para *P. foetida* no meio M2/M6 (24,97%).

Variações nos 5-mC% foram observados ao longo da resposta *in vitro* para as três espécies, demonstrando a influência da metilação da citosina do DNA nas diferentes etapas da regeneração de *Passiflora* (Figura 13). Em *P. miniata*, o 5-mC% variou ao longo da resposta *in vitro*, ocorrendo aumentos e diminuições entre as etapas, nos diferentes tratamentos utilizados (Figura 13A). Verificamos, por exemplo, um aumento acentuado do 5-mC% na etapa de indução de calos e diminuição na etapa de regeneração de embriões somáticos nos meios M1/M1, M1/M6 e M1/M7 (Figura 13A). Em *P. cristalina* e *P. foetida*, para a maioria dos tratamentos, os níveis de 5-mC% diminuíram na etapa de indução de calos e aumentaram na etapa de regeneração nos calos que formaram brotos (Figura 13B e 13C).

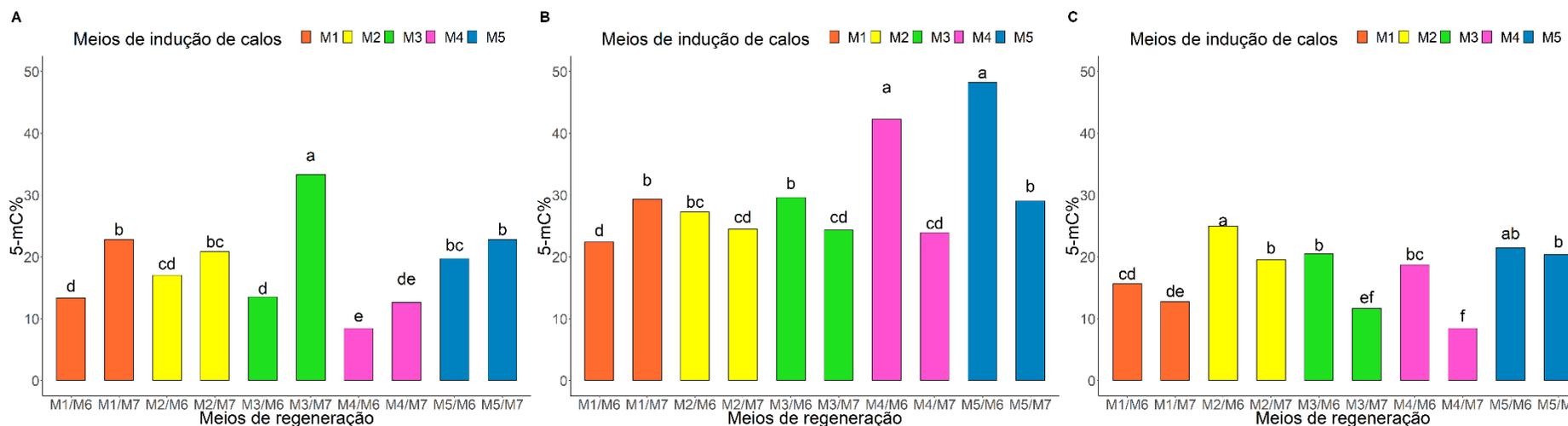


Figura 12 – Nível médio de 5-mC% nos meios M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7, que deram origem aos embriões somáticos em *P. miniata* (A) ou brotos em *P. cristalina* (B) e *P. foetida* (C). Colunas seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os meios de regeneração em cada espécie pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

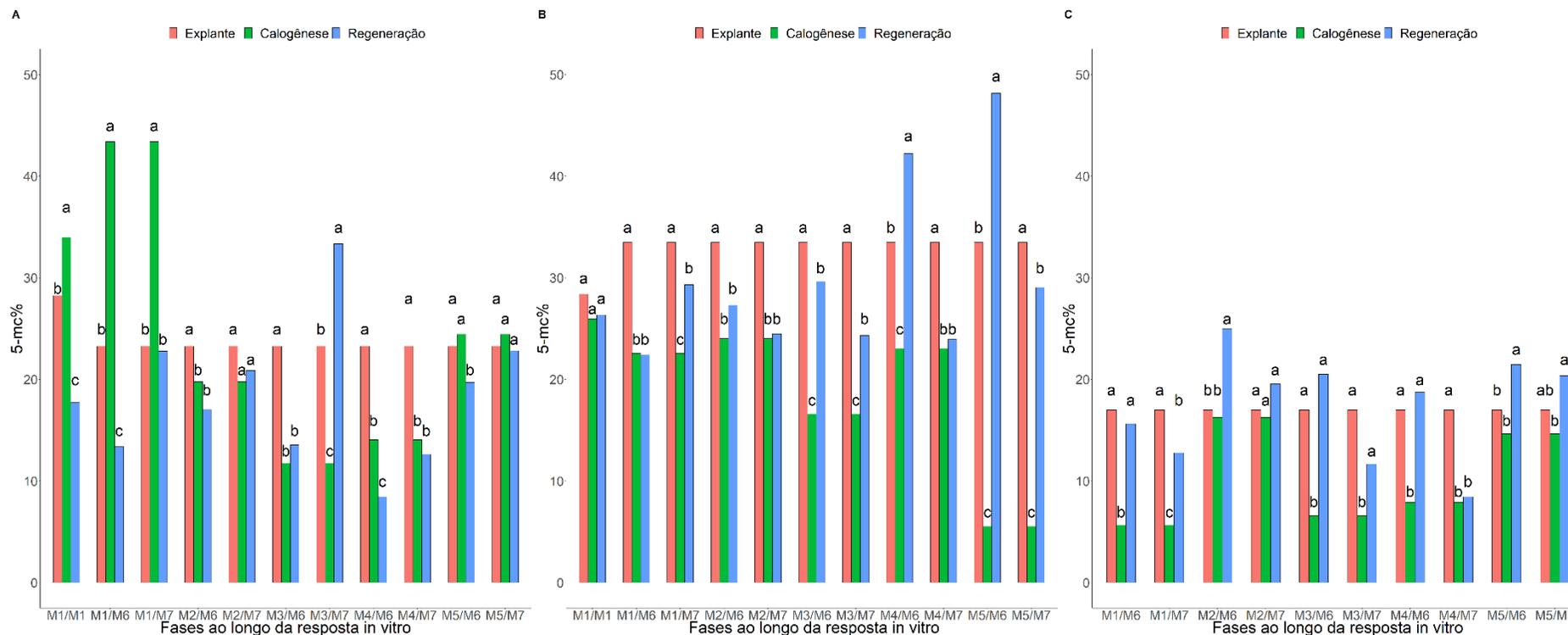


Figura 13 – Os gráficos mostram o 5-mC% ao longo da resposta *in vitro* para as três espécies: (A) *P. minata* via ESI, (B) *P. cristalina* via OI e (C) *P. foetida* via OI. Cada trio de colunas representa como foi a metilação no explante, em seguida no calo ao final de 35 dias em cada meio de indução da calogênese e após a formação de embriões ou brotos após transferência para o meio de regeneração. Colunas em vermelho mostram o 5-mC% nos explantes utilizados para inoculação (EZI no M1 e EZM nos meios M6 e M7). As colunas em verde, o 5-mC% nos calos formados

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO – PPGGM



ao final de 35 dias nos diferentes meios de indução da calogênese (M1 – M5) e as colunas em azul, o 5-mC% nos calos que deram origem a embriões somáticos ou brotos nos diferentes meios de regeneração (M1/M6, M1/M7, M2/M6, M2/M7, M3/M6, M3/M7, M4/M6, M4/M7, M5/M6 e M5/M7). As médias dos 5-mC% foram comparados pelo teste de Tukey, onde colunas com letras distintas indicam diferença significativa entre os momentos da resposta *in vitro* (explante, calogênese e regeneração) ($P < 0,05$). Como supramencionado, em *P. foetida* não houve a formação de calos e nem a formação de embriões somáticos ou brotos no meio M1/M1, portanto, esta comparação não foi realizada.

DISCUSSÃO

Conforme nossos dados demonstram, diferentes fatores influenciaram nas respostas morfogênicas distintas nas espécies de *Passiflora*, como o tipo de explante, as diferentes condições de cultivo *in vitro* e os 5-mC%. Para a resposta via ESI em *P. miniata*, a maior formação de embriões somáticos foi desencadeada pela utilização de EZI, ausência de reguladores de crescimento e de carvão ativado, aumento do 5-mC% na etapa de indução da calogênese e diminuição na etapa de regeneração. O oposto foi observado para a resposta via OI em *P. cristalina* e *P. foetida*, sendo a maior formação de brotos desencadeada pela utilização de EZM, presença de reguladores de crescimento e de carvão ativado, diminuição do 5-mC% na etapa de indução da calogênese e aumento na etapa de regeneração. Além disso, verificamos que os 5-mC% das três espécies foram influenciados pelo tipo de explante, pelas diferentes concentrações de 2,4-D nos meios de indução da calogênese e pela presença ou ausência de carvão ativado nos meios de regeneração.

Devido às distintas etapas para o estabelecimento *in vitro*, foi necessário analisá-las separadamente, desde os explantes utilizados para inoculação, os calos formados ao final de 35 dias em meio de indução da calogênese e os calos que deram origem à embriões somáticos ou brotos na etapa de regeneração. O tipo de explante utilizado influenciou na resposta *in vitro* nas três espécies de *Passiflora*. Tecidos jovens, como os embriões zigóticos, apresentam altos níveis de ácido indolacético (AIA), especialmente no estágio de desenvolvimento ainda imaturo (Jayaraj et al. 2015; Mikula et al. 2015). Portanto, são considerados excelentes fontes de explantes para indução da regeneração *in vitro* (Gaj 2004; Elhiti e Stasolla 2011; Ferreira et al. 2015; Hu et al. 2017; Leite et al. 2019). As diferenças nas respostas entre os tecidos maduros e imaturos também podem ser epigenéticas, uma vez que o tecido maduro é altamente diferenciado (von Arnold 2008). Com a diferenciação das células e dos tecidos vegetais, a proporção de células-tronco totipotentes diminui, podendo prejudicar a resposta



in vitro (Campos et al. 2017). Portanto, esperava-se que os 5-mC% fossem maiores nos EZM do que nos EZI, porém, isso foi observado apenas em *P. cristalina*. Essas respostas contraditórias podem estar relacionadas às características inerentes aos doadores de explante de cada espécie (Hasbún et al. 2005; Wang et al. 2012).

Algumas células vegetais mantêm a sua totipotência e sob estímulos adequados podem promover a proliferação celular (Campos et al. 2017). Neste estudo, os embriões zigóticos já diferenciados das espécies de *Passiflora* deram origem a calos. Exceto *P. foetida*, que não houve a formação de calos friáveis a partir dos EZI inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento. Isso pode ser explicado pela ausência de estímulos suficientes, pelas diferenças fisiológicas dos explantes na capacidade de transportar auxinas ou pelas células dos explantes não manterem a sua capacidade totipotente independente do estímulo (Campos et al. 2017). Apesar de ocorrer a formação de calos friáveis, no meio sem adição de reguladores de crescimento em *P. cristalina* e *P. miniata*, as taxas foram baixas em comparação com os meios suplementados com reguladores de crescimento para as três espécies. Campos et al. (2017) relataram a importância do uso de auxinas na proliferação celular, mesmo sem passar pelo processo de desdiferenciação celular. Por isso a maior taxa de calos nos meios contendo diferentes concentrações de 2,4-D. Esses dados destacam a importância do tipo de explante e do 2,4-D na morfogênese.

O uso de reguladores de crescimento, como 2,4-D e BAP são amplamente utilizados para induzir a formação de calos na primeira etapa da morfogênese *in vitro* para espécies do gênero *Passiflora*, seja via OI ou ESI (Ozarowski e Thiem 2013; Ferreira et al. 2015; Rocha et al. 2015; Pacheco et al. 2016; Leite et al. 2019). O mesmo foi observado em outros estudos com diferentes espécies de *Passiflora* quando submetidos a concentrações inferiores a 72,48 μM de 2,4-D, como *P. foetida*, *Passiflora ligularis* Juss, *P. miniata*, *Passiflora coriacea* Juss., *Passiflora contracta* Vitta, *Passiflora lindeniana* TR & Planch e *Passiflora speciosa* Gardn. (Ferreira et al. 2015; Rosa et al. 2015; Prudente et al. 2017;



Leite et al. 2019). Em *P. miniata*, os maiores 5-mC% foram observados nos calos originados a partir dos EZI e EZM inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento. Osorio-Montalvo et al. (2020) relataram que a desdiferenciação dos explantes é acompanhada por um aumento na metilação do DNA, que pode ser causada pelos efeitos de auxinas endógenas. Alterações nos níveis de metilação da citosina do DNA também podem ser induzidas por estresse causado pelas condições do ambiente *in vitro* e não especificamente pela ação de auxinas (Phillips et al. 1990). Nos demais meios com diferentes concentrações de 2,4-D (M2, M3, M4 e M5), os 5-mC% foram menores quando comparados ao M1, porém, este nível tende a aumentar com o aumento da concentração de 2,4-D. Essa auxina sintética pode atuar aumentando os níveis endógenos de ácido indolacético (AIA) e estimulando a reprogramação gênica, o alongamento, a divisão e sinalização celular, assim como promovendo a hipermetilação do DNA (Pasternak et al. 2002; Fehér et al. 2003; Karami e Saidi 2010). Amaral-Silva et al. (2021), avaliando o conteúdo global de 5-mC durante a ESI em *C. canephora*, observaram menores 5-mC% no meio suplementado com 2,4-D, assim como observado neste estudo. Nestes casos, a hipometilação parece estar relacionada ao próprio processo de proliferação celular (Elhiti et al. 2010; Grzybkowska et al. 2018).

Em *P. cristalina*, o aumento da concentração de 2,4-D nos meios de indução da calogênese promoveu uma diminuição dos 5-mC%. Nesta etapa, eventos de desmetilação são comuns antes dos processos de diferenciação (Valledor et al. 2007), que podem estar associados à ação de diferentes concentrações de 2,4-D nos meios de cultura *in vitro* (LoSchiavo et al. 1989). O 2,4-D tem demonstrado um papel importante durante o processo de proliferação celular ocasionado por estresse (Fehér 2015). Já em *P. foetida*, as diferentes concentrações de 2,4-D não influenciaram nos 5-mC%. Essas evidências indicam que a metilação do DNA é influenciada por questões intrínsecas do próprio calo, como aspectos genéticos e fisiológicos, e não necessariamente com a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura *in vitro* (George

et al. 2008; Elhiti et al. 2010; Grzybkowska et al. 2018). Assim, a adição do 2,4-D ao meio de indução da calogênese nem sempre resulta no aumento da metilação global do DNA, uma vez que as espécies apresentaram diferentes respostas sobre as mesmas condições.

O desenvolvimento de embriões somáticos ou de brotos é estimulado após a remoção dos reguladores de crescimento na etapa de regeneração *in vitro*, pois a presença contínua de auxinas e citocininas inibem a diferenciação (LoSchiavo et al. 1989; Silva et al. 2009; Rosa et al. 2015; Altamura et al. 2016). Como mencionado anteriormente, apesar de utilizar o mesmo explante e o mesmo meio de cultura para induzir a embriogênese somática *in vitro*, diferentes respostas morfogênicas foram observadas para as espécies estudadas neste trabalho. *P. cristalina* e *P. foetida* regeneraram brotos via OI e *P. miniata*, embriões somáticos via ESI. No gênero *Passiflora*, a regeneração via ESI foi observada apenas para espécies do subgênero *Passiflora* L. que possuem $2n = 18$ cromossomos (Ozarowski e Thiem 2013; Ferreira et al. 2015; Leite et al. 2019; Mikovski et al. 2019). Visto às semelhanças no número de cromossomos e conteúdo de DNA de *P. cristalina* ($2n = 18$; $2C = 3,11$ pg) com *P. miniata* ($2n = 18$; $2C = 3,40$ pg), nossa expectativa inicial de que as respostas *in vitro* seriam semelhantes não foi confirmada. Embora as células vegetais sejam altamente plásticas, ainda é difícil induzir a formação de embriões somáticos em *Passiflora* (Leite et al. 2019; Mikovski et al. 2019; Wu et al. 2020). A razão pela qual algumas espécies respondem por vias morfogênicas distintas, mesmo nas mesmas condições *in vitro*, ainda é pouco compreendida (Gordon et al 2007; Xu e Huang et al. 2014, Leite et al. 2019). Porém, de acordo com Campos et al. (2017), algumas células nunca se tornarão um embrião somático independente do estímulo fornecido *in vitro*. Neste estudo apenas *P. miniata* apresentou células responsivas que mantiveram a sua capacidade embriogênica.

Na regeneração de *P. miniata*, a adição de carvão ativado ao M7 inibiu a formação de embriões somáticos e permaneceram indiferenciados como calos. Leite et al. (2019) também observaram a inibição da formação de embriões

somáticos no meio suplementado com carvão ativado. Estudos apontam que o carvão ativado pode ser prejudicial à formação de embriões somáticos (Heringer et al. 2015). Em meio de cultura suplementado com 3% de carvão ativado, os números de embriões somáticos foram 5 vezes menores do que no meio com metade dessa concentração (Heringer et al. 2015). Além de adsorver substâncias indesejáveis, como o excesso de 2,4-D, o carvão ativado também pode adsorver substâncias necessárias para o desenvolvimento dos embriões somáticos, como macro e micronutrientes, vitaminas e sacarose (Pan e van Staden 1998; Thomas 2008). Vale ressaltar que os 5-mC% mais elevados foram observados no meio suplementado com carvão ativado, assim como relatado por Oliveira et al. (2021). Outros autores também mostraram um maior nível de metilação global do DNA em culturas não embriogênicas e um menor nível em culturas embriogênicas de *Pinus radiata* D. Don, *Pinus nigra* J.F. Arnold e *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Ex Maxim.) Maxim. (Chakrabarty et al. 2003; Noceda et al. 2009; Bravo et al. 2017). O aumento no 5-mC% durante a indução de calos e diminuição na etapa de regeneração, rendeu a maior média de embriões somáticos por calo. Portanto, a diferenciação das células em estruturas embriogênicas foi promovida por modificações no cultivo *in vitro* e por variações nos 5-mC%.

Em *P. cristalina* e *P. foetida*, foi observado o oposto ao encontrado em *P. miniata*, em que a adição de carvão ativado (M7) promoveu um aumento na taxa de recuperação de brotos via OI, assim como descrito por Leite et al. (2019). Nesse caso, o carvão ativado pode estar mais relacionado à capacidade de adsorver substâncias indesejáveis do meio de cultura, como metabólitos secundários e reguladores de crescimento residuais (Johansson et al. 1982; Pan e van Staden 1998). Além disso, o carvão aumenta a resposta via OI e a taxa de sobrevivência dos brotos regenerados (Pan e van Staden 1998). Diferente de *P. miniata*, no meio com adição de carvão ativado foram encontrados os menores 5-mC%. A metilação do DNA durante a OI é descrita como um dos mecanismos reguladores deste processo (Us-Camas et al 2004). Wang et al. (2012),



trabalhando com a organogênese *in vitro* de *Clivia miniata* (Lindl.) Verschaff., relataram que as variações nos níveis de 5-metilcitosina global do DNA dos brotos regenerados estavam relacionados à natureza dos próprios explantes. Vining et al. (2013) constataram que 45% dos genes passaram de metilados na fase de calo a desmetilados na fase de regeneração de brotos. Diferindo do que foi observado neste estudo, em que houve diminuições nos 5-mC% durante a indução de calos e aumentos na etapa de regeneração, promovendo as maiores médias de brotos em *P. cristalina* e *P. foetida*.

Assim como observado por diversos autores, as variações nos 5-mC% descritas aqui, refletem os processos de adaptação das células às diferentes condições do ambiente *in vitro*, desencadeando mudanças no desenvolvimento das plantas (Miguel e Marum 2011; Smykal et al. 2007; Valledor et al. 2007; Nic-Can et al. 2015; Zhang et al. 2018). O que torna os processos epigenéticos eventos únicos é que o ambiente promove as modificações e essas podem ser herdadas pelas próximas gerações (Becker e Weigel 2012; Yakovlev et al. 2011). Esses processos são acompanhados pela remodelação da cromatina, que permitem a expressão ou repressão de genes capazes de controlar a totipotência em células vegetais (Duarte-Aké e De-la-Peña 2016; Kumar e van Staden 2017). Essa organização da cromatina é resultado de três processos epigenéticos: metilação do DNA, modificação de histonas e miRNAs (Bird 2007; Rottach et al. 2009; Chen et al. 2010).

Os 5-mC% nas três espécies de *Passiflora* variaram de 4,66% a 49,35%. Níveis elevados também foram encontrados no gênero *Coffea* L., com até 43,61% em *Coffea canephora* L. (Amaral-Silva et al. 2021) e 42,37% no “Híbrido de Timor” autoalohexaploide sintético (Oliveira et al. 2021), indicando uma reprogramação epigenética nas células vegetais durante a regeneração *in vitro* (Zhang et al. 2018). Mudanças nos padrões de metilação do DNA ocorrem substancialmente durante os processos de morfogênese *in vitro* e variam entre as espécies de plantas (Valledor et al. 2007; Gao et al. 2010; Miguel e Marum 2011; Yang et al. 2013; Quinga et al. 2017; Osório-Montalvo et al. 2020; Amaral-

Silva et al. 2021; Oliveira et al. 2021). Essas mudanças, na maioria dos casos, dependem da natureza do explante e do genótipo inicial (George et al. 2008). No genoma nuclear de plantas superiores, as variações nos níveis de metilação da citosina são frequentes e variam de 6% a 43,61% (Gruenbaum et al. 1981; Zhang et al. 2010; Amaral-Silva et al. 2021; Oliveira et al. 2021).

Em geral, os dados aqui discutidos mostram que os diferentes estágios de desenvolvimento dos explantes utilizados para inoculação, as diferentes condições de cultivo *in vitro* e os níveis de 5-metilcitosina global do DNA influenciaram ao longo da resposta *in vitro* das três espécies de *Passiflora* avaliadas. Estes fatores demonstram que a metilação do DNA é um mecanismo complexo e variável entre as espécies e entre as vias morfogênicas *in vitro*. Os menores 5-mC% em *P. foetida* e os maiores 5-mC% em *P. cristalina* e *P. miniata*, podem ser atribuídos à fatores genéticos, uma vez que *P. foetida* possui o menor conteúdo de DNA e provavelmente o menor número de cópias de genes relacionados a morfogênese *in vitro*. De acordo com alguns autores, o conteúdo global de 5-metilcitosina do DNA varia amplamente entre as espécies, tecidos, órgãos, idade do explante e com as condições do ambiente *in vitro* (Vanyushin e Ashapkin 2011). Portanto, as diferentes respostas *in vitro* são influenciadas por diversos fatores, assim como por características intrínsecas das espécies, visto que os três táxons avaliados neste estudo estão intimamente relacionados por pertencerem ao mesmo subgênero.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, mensuramos pela primeira vez os níveis de 5-metilcitosina ao longo da resposta *in vitro*, seja via ESI ou OI para o gênero *Passiflora*. Com base nos dados aqui observados, podemos inferir que a melhor condição para regenerar embriões somáticos é: utilização de EZI, ausência de reguladores de crescimento no meio de indução de calos, ausência de carvão ativado meio de



regeneração e diminuição dos 5-mC% na etapa de regeneração. Já para regenerar brotos é necessário: utilização de EZM, presença de 2,4-D no meio de indução de calos, contendo 72,48 μM para *P. cristalina* e 36,24 μM para *P. foetida*, presença de carvão ativado no meio de regeneração e aumento dos 5-mC% na etapa de regeneração. Deste modo, as evidências supramencionadas neste trabalho revelam que os explantes, as diferentes condições de cultivo *in vitro* e as variações nos níveis de 5-metilcitosina global do DNA ao longo da regeneração *in vitro*, ocasionaram diferentes respostas morfogênicas (ESI e OI). Portanto, visto que as espécies se comportam de forma distintas, constatamos que a regeneração de plantas *in vitro* são dinâmicas e variáveis entre as espécies. Este estudo representa o início de novos estudos acerca da metilação do DNA durante a regeneração *in vitro* no gênero *Passiflora*.

REFERÊNCIAS

Aceituno FF, Moseyko N, Rhee SY, Gutiérrez RA (2008) The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. BMC genomics, 9 (1), 1-14.

Altamura MM, Della Rovere F, Fattorini L, D'Angeli S, Falasca G (2016) Recent advances on genetic and physiological bases of *in vitro* somatic embryo formation. Methods Mol Biol 1359:47–85.

Amaral-Silva, PM, Clarindo, WR, Guilhen, JHS et al (2021) Global 5-methylcytosine and physiological changes are triggers of indirect somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Protoplasma 258: 45–57. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01551-8>.

Arnholdt-Schmitt B, Herterich S, Neumann KH (1995) Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA



methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. Theoretical and applied genetics 91(5): 809-815.

Becker C, Weigel D (2012) Epigenetic variation: origin and transgenerational inheritance. Current opinion in plant biology, 15(5), 562-567. Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. Nature 447(7143): 396.

Bravo S, Bertín A, Turner A, Sepúlveda F, Jopia P, Parra MJ, Hasbún R (2017) Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non-embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 130(3): 521-529.

Campos NA, Panis B, Carpentier SC (2017) Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. Front Plant Sci 8:1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>

Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Sci 165: 61–68. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(03)00127-4).

Chen M, Lv S, Meng Y (2010) Epigenetic performs in plants. Develop Growth Differ 52: 555-566.

Cheung P, Lau P (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. Molecular Endocrinology, 19(3): 563-573.

Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Vieitez AM (2015) Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus Globulus* and *E. Saligna X E. Maidenii* Trees. Tree physiol. 35: 678–690.

Demeulemeester MAC, Stallen NV, Droft PMP (1999) Degree of DNA methylation to chicory (*Cichorium intybus* L.): Influence of plant age and



vernalization. *Plant Science* 142(1): 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00010-2).

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2016) Epigenetic advances in somatic embryogenesis in sequenced genome crops. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Springer Cham 81-102. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_6.

Elhiti M, Stasolla C (2011) The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. *Plant embryo culture* 229-255.

Elhiti M, Tahir M, Gulden RH, Khamiss K, Stasolla C (2010) Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J. Exp. Bot.* 61, 4069–4085.

Fehér A (2015) Somatic embryogenesis stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(4): 385-402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>.

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>.

Ferreira DAT, Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2015) Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for *in vitro* propagation without plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122(3): 629-638. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0796-1>.

Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA methylation in plants. *Annual review of plant biology* 49(1): 223-247.



Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current opinion in genetics & development* 10(2): 217-223.

Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27–47.
<https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb>.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151– 158.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).

Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang Q, Kimatu J, Wang L (2010) *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *J. Plant Growth Regul* (29): 257–267.

Garcia C, Furtado de Almeida AA, Costa M, et al (2019) Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137: 193–212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>.

George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: *Plant propagation by tissue culture* Springer, Dordrecht 175-204.

Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, et al. (2007) Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* (134): 3539–3548

Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292(5826): 860-862.

Grzybkowska D, Morończyk J, Wójcikowska B, Gaj MD (2018) Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic



response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. Plant Growth Regul. 85, 243–256.

Haberlandt G (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111: 69–92.

Hasbún R, Valledor L, Berdasco M, Santamaria E, Cañal MJ, Rodriguez R, ... Sánchez M (2005) *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. Acta Horticulturae, 693, 333.

Heringer AS, Barroso T, Macedo AF, Santa-Catarina C, Souza GHMF, Floh EIS, Silveira V (2015) Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. PloS ONE <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127803>

Hu R, Sun Y, Wu B, Duan H, Zheng H, Hu D et al (2017) Somatic embryogenesis of immature *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) hook zygotic embryos. Sci Rep UK 7: 56. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00156-1>

Ibrahim MSD, Hartati RRS, Rubiyo R, Purwito A, Sudarsono S (2016) The induction of primary and secondary somatic embryo to support *Arabica coffee* propagation. Journal of Tropical Crop Science; Vol 2, No 3 (2015): Vol 2, No 3 (2015).

Jayaraj KL, Bhavyashree U, Fayas TP, Sajini KK, Rajesh MK, Karun A (2015) Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. J Plant Crops 43: 196–203.

Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regul 47: 91–110. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>

Johansson L, Andersson B, Eriksson T (1982) Improvement of another culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid



medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol Plant* 54: 24–30.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00571.x>

Johansson L, Calleberg E and Gedin A (1990) Correlation between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultures of anthers of *Anemone canadensis*. *Physiol Plant* 80: 243–249

Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep* 37: 2493–2507.
<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>

Karim R, Nuruzzaman M, Khalid N, Harikrishna JA (2016) Importance of DNA and histone methylation in *in vitro* plant propagation for crop improvement: a review. *Ann Appl Biol*, 169: 1-16. <https://doi.org/10.1111/aab.12280>

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol* 27: 137A.

Kumar V, van Staden J (2017) New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiol Plant* 39: 194. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>

Leite CT, Ferreira DAT, Vieira AT, Praça-Fontes MM, Ferreira A, Carvalho CR, Clarindo WR (2019) *In vitro* responses in *Passiflora* species with different chromosome numbers, ploidy levels and nuclear 2C values: revisiting and providing new insights. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136(3): 549-560.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-01536-9>

LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325–331.
<https://doi.org/10.1007/BF00305823>



Michalczyk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Auxin levels at different stage of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31: 1097–1103.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80241-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80241-6)

Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal and beyond. *J Exp Bot* 62: 3713–3725

Mikovski AI, Silva NTD, Souza CDS, Machado MD, Otoni WC, Carvalho IF, Silva ML (2019) Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. *Ornamental Horticulture* 25(2): 189-199.

Mikovski AI, da Silva NT, Silva LAS, Machado M, de Souza Barbosa LC, Reis AC, ... & da Silva ML (2021) From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-15.

Mikuła A, Pożoga M, Tomiczak K, Rybczyński JJ (2015) Somatic embryogenesis in ferns: a new experimental system. *Plant cell rep* 34: 783–794
<https://doi.org/10.1007/s00299-015-1741-9>

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nic-Can GI, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Pena C (2013) Novos insights sobre embriogênese somática: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 e WUSCHEL -RELATED HOMEBOX4 são regulados epigeneticamente em *Coffea canephora*. *PLoS One* 8: e72160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072160>

Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, De-la-Peña C, Alcazar-Magaña A, Wrobel K, Loyola-Vargas VM (2015) Embriogênese somática: fatores identificados que



levam à repressão embriogênica. Um caso de espécies do mesmo gênero. PLoS ONE 10 (6): e0126414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126414>

Nic-Can GI, Loyola-Vargas VM (2016) The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, Cham 171–182. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_10

Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañal MJ, Salaj J, Rodriguez R (2009) DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. Trees 23: 1285. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0370-8>

Oksanen J. et al. (2017) Vegan: community ecology package. R package version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Oliveira JPM, Sanglard NA, Ferreira A, Clarindo WR (2021) Ploidy level, epigenetic and *in vitro* environment influence the indirect somatic embryogenesis of the new synthetic autoallohexaploid *Coffea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 1-11.

Osorio-Montalvo P, De-la-Peña C, Oropeza C, Nic-Can G, Córdova-Lara I, Castillo-Castro E, Sáenz-Carbonell L (2020) A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). Plant Cell Reports 39(10): 1345-1357.

Ozarowski M, Thiem B (2013) Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. Revista Brasileira de Farmacognosia 23(6): 937-947. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600011>

Pacheco G, Simão MJ, Vianna MG, Garcia RO, Vieira MLC, Mansur E (2016) *in vitro* conservation of *Passiflora*: a review. Sci Horticult 211:305–311. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>



Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture: a review. *Plant Grow Reg* 26: 155–163. <https://doi.org/10.23/A:1006119015972>

Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Fehér A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant physiology* 129(4): 1807-1819.

Phillips GC, Garda M (2019) Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 55(3): 242-257.

Quinga LAP, Freitas Fraga HP, Nascimento Vieira L, Guerra MP (2017) Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131(2): 295-305.

R Development Core Team (2020) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rocha DI, Monte-Bello CC, Dornelas MC (2015) Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120:1087–1098. doi: 10.1007/s11240-014-0663-5

Rosa YBCJ, Bello CCM, Dornelas MC (2015) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 69–77. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0580-7>

Rosa YBCJ, Dornelas MC (2012) *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 91-99. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0016-6>



Rottach A, Leonhardt H, Spada F (2009) DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of cellular biochemistry*, 108(1), 43-51.

Satish L, Rathinapriya P, Rency AS, Ceasar SA, Pandian S, Rameshkumar R et al (2016) Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and *Padina boergesenii* seaweed liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine coracana*). *J Appl Phycol* 28: 2083–2098. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0696-0>

Silva ML, Pinto DLP, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 47-54. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9574-2>

Silva NT, Silva LAS, Reis AC et al. (2020) Cultura de endosperma: uma ferramenta biotecnológica fácil e eficiente para gerar plantas triploides de maracujá (*Passiflora cincinnata* Mast.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 142, 613–624 <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01887-2>

da Silva ML, Pinto DLP, de Campos JMS, de Carvalho IF, Rocha DI, Batista DS, Otoni WC (2021) Repetitive somatic embryogenesis from wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) anthers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-7.

Smýkal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M (2007) Avaliação da estabilidade genética e epigenética em cultura *in vitro* de ervilha (*Pisum sativum* L.) em longo prazo. *Plant cell reports*, 26 (11), 1985-1998.

Tang LP, Zhang XS, Su YH (2020) Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *BIOTECH* 1-9.

Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26: 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>



Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2014) *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118:187201. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0482-8>

Valledor L, Hasbún R, Meijón M, Rodríguez JL, Santamaría E, Viejo M, et al. (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91(2): 75-86.

Vanyushin BF, Ashapkin VV (2011) DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms* 1809(8): 360-368 <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.006>

Vining K, Pomraning KR, Wilhelm LJ, et al. (2013) Methylome reorganization during *in vitro* dedifferentiation and regeneration of *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* 13, 92 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-92>

von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (69): 233-249.

Wang QM, Wang YZ, Sun LL, et al. (2012) Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. *Plant Cell Rep* 31: 1283–1296. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1248-6>

Weatherhead MA, Burdon J, Henshaw GG (1978) Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z Pflanzenphysiol* 89: 141–147

Wu GY, Wei XL, Wang X, Wei Y (2020) Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 142(2): 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01822-5>



Xu L, Huang H (2014) Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Curr Top Dev Biol* 108: 1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00009-7>

Yakovlev IA, Asante DK, Fossdal CG, Junttila O, Johnsen Ø (2011) Expressão diferencial de genes relacionada a uma memória epigenética que afeta a adaptação climática no abeto da Noruega. *Plant Science*, 180 (1), 132-139.

Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot* 64: 1521–1536. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert013>

Zhang H, Lang Z, Zhu J (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 19: 489–506. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>

Zhang M, Kimatu JN, Xu K, Liu B (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *J Genet Genomics* 37:1–12. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60020-5](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60020-5)