

THAÍS CRISTINA RIBEIRO DA SILVA

**HETEROGENEIDADE VERTICAL DA PLOIDIA DE DNA EM CALOS DE
Passiflora cincinnata ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFRV

T

S586h
2012

Silva, Thais Cristina Ribeiro, 1988-
Heterogeneidade vertical da ploidia de DNA em calos de
Passiflora cincinnata analisada por citometria de fluxo / Thais
Cristina Ribeiro Silva. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 39f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 28-39

1. *Passiflora cincinnata*. 2. Células vegetais - Cultura e
meios de cultura. 3. Embriogênese somática. 4. Citometria de
fluxo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 634.4257

THAÍS CRISTINA RIBEIRO DA SILVA

**HETEROGENEIDADE VERTICAL DA PLOIDIA DE DNA EM CALOS DE
Passiflora cincinnata ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO**

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

APROVADA: 17 de julho de 2012



Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Coorientador)



Wellington Ronaldo Clarindo



Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

*“But take your time, think a lot
I think of everything you've got
For you will still be here tomorrow”
Father and Son – Cat Stevens*

À minha família, fonte de amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do Curso, pelo aprendizado e por me tornar uma pesquisadora nessa instituição de ensino superior de alta qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa indispensável para realização desse trabalho.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho pela orientação, amizade, confiança, incentivo, ensinamentos em todos os momentos, e paciência com todo meu “pessimismo”.

Aos professores Sérgio Yoshimitsu Motoike e Wellington Ronildo Clarindo pela colaboração e participação neste trabalho.

Aos meus pais, Fernando e Gisele e irmãos, Matheus e Fernando Thiago pelo apoio e torcida, por suportar a distância e acreditar nos meus ideais. E todos outros familiares que direta ou indiretamente me ajudaram nessa caminhada.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Chris, Fernanda, Paulo, Andréa, Maíra, Ana Paula pela ajuda na execução desse trabalho e pelos bons momentos de trabalho e descontração. Em especial, a Isabella e a Sirlei pelas ideias, sugestões, correções, companheirismo durante os períodos de tensão e também pelos momentos de alegria compartilhados. E ao Guilherme, que com todo amor suportou os dias de cansaço, estresse e nervosismo e, acima disso, me ajudou a passar por tudo com mais tranquilidade, calma e alegria.

A todos os professores da Universidade Federal de Viçosa que participaram e contribuíram em minha formação, tanto acadêmica e profissional, quanto pessoal.

Às minhas amigas, Adryele, Annamara, Tatiane, Ariadina e Jussara que, mesmo com a distância, torcem pelo meu sucesso e me apoiam em minhas decisões e nas etapas da minha vida acadêmica.

Às meninas da república, Érica e Fran, minha segunda família.

A Deus pelo dom da vida! E Nossa Senhora de Fátima e Santa Rita de Cássia pela intercessão.

BIOGRAFIA

Thaís Cristina Ribeiro da Silva, filha de Fernando Antonio Ribeiro da Silva e Gisele Cristina Gabrioli da Silva, nasceu em São Paulo – SP, no dia 09 de abril de 1988.

Em 2006, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. Escolheu como ênfase Genética e Biologia Molecular e, em julho de 2010, se graduou como bacharela, recebendo votos de louvor pelo desempenho acadêmico entre os formandos.

Durante o período de graduação foi bolsista de iniciação científica FAPEMIG no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da UFV, e durante seis meses foi bolsista do CNPq no Departamento de Estatística também da UFV.

Em agosto de 2010, iniciou o Mestrado no Programa de Genética e Melhoramento da UFV, continuando atuar na linha de pesquisa que utiliza as ferramentas citogenéticas e de citometria na cultura de tecidos vegetais.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Embriogênese Somática	1
1.1.1. Variação Somaclonal	3
1.1.2. Ultraestrutura de calos.....	6
1.2. Citometria de Fluxo.....	7
1.2.1. Aspectos Gerais.....	7
1.2.2. Aplicação da CF em calos.....	9
1.3. Maracujá (<i>Passiflora cincinnata</i>).....	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material Vegetal	14
3.2. Germinação	14
3.3. Indução de Embriogênese.....	14
3.4. Citometria de fluxo.....	15
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	28

RESUMO

SILVA, Thaís Cristina Ribeiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Heterogeneidade vertical da ploidia de DNA em calos de *Passiflora cincinnata* analisada por citometria de fluxo.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Sérgio Yoshimitsu Motoike e Andréa Dias Koehler.

Técnicas de cultura de tecidos estão frequentemente associadas com a ocorrência de variação somaclonal, caracterizada pela alteração genética e/ou epigenética encontrada em células, embriões, órgãos ou plantas cultivadas *in vitro*, em decorrência das condições de estresse impostas pelo sistema. O processo de propagação que envolve a etapa de calogênese apresenta maior susceptibilidade à ocorrência de variação, em função das inúmeras divisões celulares. Calos são massas celulares não organizadas, cujas células se dividem a diferentes velocidades dependendo de onde se localizam em relação ao meio de cultura; portanto, não são considerados materiais homogêneos. A citometria de fluxo é uma ferramenta que tem sido utilizada para avaliar a competência da embriogênese somática em calos, tanto para identificar seus diferentes tipos quanto para detectar precocemente possíveis alterações no conteúdo de DNA de suas células. No entanto, não há relatos na literatura da utilização da citometria de fluxo para verificar a existência da heterogeneidade quanto ao conteúdo de DNA em calos. Nesta perspectiva, o presente trabalho adaptou essa metodologia para calos friáveis de *Passiflora cincinnata*, a fim de verificar a existência de heterogeneidade verticalmente regionalizada, em relação à ploidia de DNA, e relacioná-la com fatores de indução de variação somaclonal, como tempo de cultivo e número de subcultivos. Inicialmente, folhas cotiledonares de *P. cincinnata* foram inoculadas em meio semissólido contendo 2,4-D e BA, para indução de calos embriogênicos friáveis. Os calos foram multiplicados e subcultivados em diferentes tempos, gerando, assim, três tipos de calos, denominados como novos, intermediários e velhos. Vinte calos de cada tipo foram submetidos a cortes sagitais que resultaram duas camadas (I e II) em calos novos, e três camadas (I, II e III) em calos intermediários e velhos, totalizando 160 amostras que foram analisadas por citometria de fluxo. Seis diferentes ploidias de DNA e multiploidias foram detectadas nas camadas. Em calos novos, 25% deles foram heterogêneos, ou seja, pelo menos uma camada apresentou nível de ploidia de DNA diferente das demais, diferentemente dos calos intermediários e velhos, os quais 75%

e 63% foram heterogêneos, respectivamente. Os calos novos homogêneos foram predominantemente diploides. As ploidias de DNA mais altas foram observadas nas camadas em contato com o meio de cultura em calos intermediários, e células 4C e 4C/8C foram mais evidentes em calos velhos. Essas observações sugerem que o surgimento de novos níveis de ploidia entre as camadas e entre os calos de diferentes tipos está relacionado com o tempo de exposição ao meio contendo concentração relativamente alta de 2,4-D. Foi possível, também, verificar que a camada em contato com o meio é mais proliferativa quando se comparou os percentuais dos picos G₂ de calos diploides homogêneos. A heterogeneidade quanto ao nível de ploidia de DNA entre as camadas foi constatada e isto implica que partes de um calo não podem inferir sobre um calo inteiro. Esse trabalho sugere que o tempo influenciou o surgimento de diferentes ploidias de DNA em calos induzidos *in vitro*.

ABSTRACT

SILVA, Thaís Cristina Ribeiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Vertical heterogeneity of DNA ploidy in *Passiflora cincinnata* calluses analyzed by flow cytometry.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Sérgio Yoshimitsu Motoike and Andréa Dias Koehler.

Tissue culture techniques are often associated with the occurrence of somaclonal variation, characterized by a genetic/epigenetic alteration found in cells, embryos, organs or *in vitro* grown plants, due to stress conditions imposed by the system. The propagation process involving the calogenesis step has a higher susceptibility to variation, because of many cell divisions. Calli are disorganized cell masses, whose cells divide at different rates depending on where they are located in relation to the culture medium, therefore, they are not considered homogeneous materials. Flow cytometry is a tool that has been used to evaluate the competence of somatic embryogenesis in callus, both to identify the different types as possible and to detect early changes in DNA content of their cells. However, there are no reports in the literature of the flow cytometry use to determine the existence of heterogeneity in relation to the DNA content in callus. In this perspective, the present work adapted this methodology for friable *Passiflora cincinnata* calli in order to verify the existence of vertically regionalized heterogeneity in relation to DNA ploidy level, and relate it to factors inductors of somaclonal variation, such as cultivation time and subculture numbers. Initially, *P. cincinnata* cotyledonary leaves were inoculated onto semi-solid medium containing 2, 4-D and BA, for friable embryogenic callus induction. The calli were multiplied and subcultured at different times, thus generating three callus types: new, intermediate and old. Twenty calli of each type were subjected to sagittal cuts resulting two layers (I, II) in new calli, and three layers (I, II and III) in intermediate and old calli, totalizing 160 layers, which were analyzed by flow cytometry. Six different DNA ploidy levels and multiploidies were detected in the layers. In new calli, 25% were heterogeneous, i.e. at least one callus layer showed different DNA ploidy level from the others, differently from intermediate and old calli, which 75% and 63% were heterogeneous, respectively. The homogeneous new calli were predominantly diploid. The highest DNA ploidy levels were observed in the layers in contact with the culture medium on intermediate calli, and 4C and 4C/8C cells were more evident in older calli. These observations suggest that the appearance of new DNA ploidy levels between the layers and

between the different callus types is related to the exposure time to the medium containing relatively high concentration of 2,4-D. It was also possible to verify that the layer in contact with the culture medium is more proliferative when compared the percentages of the G₂ peaks in homogeneous diploid calli. The heterogeneity in DNA ploidy level between the layers was observed, and it implies that parts of a callus cannot infer about a whole callus. This work suggests that time influences the appearance of different DNA ploidy levels in calli induced *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Embriogênese Somática

A multiplicação/micropropagação clonal tem sido um dos componentes da biotecnologia mais explorado comercialmente (RANI & RANIA, 2000). Entre os vários sistemas aplicados para micropropagar plantas *in vitro*, a embriogênese somática (ES) é o sistema mais utilizado e tem sido considerada a principal rota da micropropagação de plantas (VASIL, 1994) além de oferecer oportunidades para produção de plantas geneticamente fiéis (GAJ, 2004).

A ES é uma ferramenta valiosa e pode ser utilizada para outros fins além da propagação clonal de plantas elite *in vitro* em larga escala (OSUGA et al., 1999), como para produção de sementes sintéticas e fonte de explantes para a criopreservação de espécies em extinção (GRAY et al., 1991) e é uma estratégia para estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião. (ZIMMERMAN, 1993; RAEMARKERS et al., 1995; DEO et al., 2010). Além disso, a embriogênese via calo pode ser útil em técnicas de transformação genética (SMITH et al., 2002; WANG et al., 2011).

Reinert (1958) e Steward et al. (1958) apresentaram, pela primeira vez, resultados sobre a regeneração de embriões a partir de células somáticas de cenoura (*Daucus carota*). A partir de então, esforços têm sido empregados para induzir ES em diversas espécies vegetais. Em 1995, já haviam sido descritos mais de 200 protocolos de ES para diferentes plantas (RAEMARKERS et al., 1995).

A ES é um processo pelo qual células somáticas se desenvolvem em embriões que darão origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986; KUNITAKE & MII, 1998). A estrutura bipolar do embrião somático e as suas etapas de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) são as mesmas dos embriões zigóticos. No entanto, embriões somáticos diferem dos zigóticos por se desenvolverem sem correlações físicas, fisiológicas e genéticas, e a partir de um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante. Além disso, não há diferenciação do endosperma, e o tecido suspensor é raro (HACCIUS, 1978; ZIMMERMAN, 1993; DODEMAN et al., 1997; GUERRA et al., 1999; VON ARNOLD et al., 2002).

A ES pode ser direta (ESD) ou indireta (ESI). A ESD implica a existência de células somáticas competentes e/ou pré-embriônicas que são capazes de empreender a via embriogênica do explante primário, podendo constituir-se em embriões com pouca reprogramação em relação à modalidade indireta. Já a ESI implica, por sua vez, em sucessivas desdiferenciações celulares (calos), e em reorganização da sua fisiologia, de seu metabolismo, e de sua expressão gênica na constituição do embrião (SHARP et al., 1980; EVANS et al., 1981).

O processo de regeneração inicia-se com a formação de meristema, que pode ter sua origem uni- ou multicelular. Essa origem está diretamente relacionada ao comportamento coordenado das células vizinhas como um grupo morfogenético. Quando os embriões têm origem unicelular, divisões celulares coordenadas são observadas e o embrião, algumas vezes, se conecta com o tecido materno por uma estrutura parecida com um suspensor (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Em contraste, embriões de origem multicelular são, inicialmente, observados como uma protuberância, sem divisões coordenadas e a região basal é tipicamente fusionada com o tecido materno. Ambas as rotas têm sido verificadas tanto na ESD como na ESI (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Quando um explante polissomático (tecido que apresenta células somáticas com diferentes ploidias) é utilizado para indução de ES e o meristema do embrião se origina a partir de muitas células, o resultado pode ser a obtenção de plantas mixoploides (GILISSEN et al., 1994).

Para induzir os explantes a entrarem em uma rota embriogênica, muitas vezes, é necessário que haja reguladores de crescimento vegetal (RCV) no meio de cultivo, principalmente as auxinas, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a auxina sintética mais eficiente para ES (DUDITS et al., 1991; FEHÉR et al., 2003). A auxina inibe a expressão dos genes por aumentar a metilação do DNA (LO SCHIAVO et al., 1989). No entanto, o desenvolvimento de embriões em tecidos somáticos também tem sido reportado na ausência de reguladores de crescimento (CHOI et al., 1998), ou ainda com indutores não hormonais, como estresse osmótico (KAMADA et al., 1993) e íons de metais pesados (PASTERNAK et al., 2002).

A ES pode ser induzida a partir de vários tipos de explantes: folhas, raízes, meristemas, cotilédones, embriões zigóticos, sementes, pecíolos. Dentre os mais diversos explantes, embriões zigóticos imaturos são os mais empregados, tendo sido utilizados em mais de um quinto dos protocolos estabelecidos, segundo relato de Gaj (2004). Explantes jovens têm sido considerados os mais competentes para ES, por

apresentarem uma condição endógena mais permissiva a estímulos físicos e químicos, possibilitando células diferenciadas a se tornarem embriões somáticos (ZIMMERMANN, 2010).

Algumas espécies ou genótipos podem ter suas culturas embriogênicas subcultivadas por um período de tempo prolongado, em meio contendo RCV, sem perder seu potencial embriogênico, isto é, a capacidade de produzir embriões somáticos maduros, que podem se desenvolver em plantas. No entanto, a ocorrência de variação somaclonal aumenta com o cultivo prolongado (VON ARNOLD et al., 2002) e a poliploidização decorrente do cultivo tem sido relacionada, por alguns autores, com a perda de totipotencialidade (COLIJN-HOOYMANS et al., 1994; KUBALÁKOVÁ et al., 1996).

1.1.1. Variação Somaclonal

A variação somaclonal (VS) é a alteração genética e/ou epigenética existente entre o material clonado e a planta doadora correspondente, gerada por meio do cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais (SKIRVIN, 1978; LARKIN & SCOWCROFT, 1981). As variações genéticas incluem alterações cromossômicas numéricas e estruturais, mutações gênicas, ativações de elementos transponíveis, permutas entre cromátides-irmãs, inserções e deleções no DNA, e alterações no DNA mitocondrial e cloroplastidial; enquanto a epigenética caracteriza-se por mudanças no padrão de metilação da cromatina (SKIRVIN et al., 2000, BENNICI et al., 2004, SMÝKAL et al., 2007).

A literatura reporta duas origens principais da ocorrência de VS: a partir de células mutantes pré-existentes nos tecidos somáticos parentais ou a partir de mutações induzidas pela própria condição de estresse imposta pelo cultivo *in vitro* (GEORGE, 1993; BAIRU et al., 2011). As mutações pré-existentes ocorrem quando o mecanismo de controle da divisão celular falha, de modo que erros replicativos podem resultar em anormalidades celulares (SKIRVIN et al., 2000). As células anômalas, normalmente, morrem ou deixam de dividir, ficando ocultas no tecido parental que as rodeia. Em ocasiões raras, as células anômalas podem se tornar parte de um meristema e crescer para constituir uma parte significativa do corpo da planta, desenvolvendo-se em quimeras de várias complexidades. Conseqüentemente,

regenerar plantas inteiras a partir desses tecidos pode produzir indivíduos que diferem da linhagem parental (HARTMANN & KESTER, 1983).

Os fatores que têm sido relacionados com o sistema *in vitro* conhecidos por induzir a variação somaclonal são: método de propagação escolhido (ESD, ESI, vias organogênicas, etc.); genótipo e natureza do tecido utilizado como material fonte; tipo e concentração dos reguladores de crescimento; além do número e duração dos subcultivos (BAIRU et., 2011). Quanto ao método de propagação escolhido, aqueles que passam pela etapa de calogênese apresentam maior susceptibilidade à ocorrência de VS (KARP, 1989; SMÝKAL et al., 2007). Nesta fase, a maioria das anormalidades genéticas se acumula, pois é quando ocorrem sucessivas divisões celulares que darão origem à massa celular. Essas anormalidades podem ou não ser transferidas para as plantas regeneradas (PHILLIPS et al., 1994). As variações detectadas podem se divergir de calo para calo e, até, em partes do mesmo calo, visto que estes geralmente se encontram em um ambiente não uniforme. Por exemplo, células de um calo perto do meio de cultura e longe dele sofrem diferentes intensidades de estresse ambiental, e apresentam velocidade de divisão desigual (WANG & WANG, 2012).

Em relação aos RCV, os efeitos causados por estes na taxa de variação somaclonal são indiretos, pois aumentam a taxa de multiplicação e indução de brotações adventícias, influenciando, assim, a frequência de alterações cariotípicas (numéricas ou estruturais) nas células (BAYLISS, 1975; SKIRVIN, 1978). A variação numérica do tipo poliploidia pode ocorrer de acordo com algum dos seguintes mecanismos: endorreduplicação, fusão nuclear e endomitose (D'AMATO & BAYLISS, 1985; JOUBÈS & CHEVALIER, 2000; KASHA, 2005). Entre esses, a endorreduplicação é o evento mais comum para o aumento da ploidia (BARLOW, 1978).

Considerando ainda o efeito de RCV, auxinas são os principais reguladores utilizados em protocolos de ES, especialmente o 2,4-D, conforme relatado anteriormente. Esta auxina atua como herbicida causando um desbalanço na auxina endógena (PILLMOOR & GAUNT, 1981; QUE HEE & SUTHERLAND, 1981), afeta padrões elétricos (GOLDSWORTHY & MINA, 1991) e, conseqüentemente, a permeabilidade da membrana (SCHAUF et al., 1987). Além disso, herbicidas auxínicos tem mostrado interagir na síntese do etileno e do ácido abscísico (ABA), aumentando os níveis celulares desses hormônios do estresse (GROSSMANN, 2000;

WEI et al., 2000). Outra característica do 2,4-D é de ser uma auxina altamente persistente, apresentando forte resistência à degradação enzimática e conjugação (MOORE, 1989). De acordo com os resultados de Mishiba et al. (2001), as auxinas 2,4-D e picloram causaram um drástico aumento da proporção de células 8C em suspensão, enquanto as duas citocininas testadas benzilaminopurina (BA) e tidiazuron (TDZ) resultaram em menores frequências desse tipo de células. Além disso, o tratamento com 2,4-D obstruiu a proliferação celular e as células devem permanecer no ciclo celular ou endorreduplicar. Liscum & Hangarter (1991) também descreveram que o 2,4-D favoreceu a endorreduplicação em tecido haploide de petúnia.

Entretanto, independente de fatores físicos e ambientais, é possível que embriões e plântulas se diferenciem seletivamente de acordo com as células que lhes darão origem. Embriões zigóticos de melão (*Cucumis melo*) foram utilizados como explantes para induzir ES em meio suplementado com 2,4-D, ácido naftalenoacético (ANA) e BA; e foi realizada contagem cromossômica de calos, embriões e plântulas. Em 129 calos analisados, 41,9% foram diploides, 27,9%, tetraploides, e 11,6%, octaploides. Nas análises realizadas em embriões e plântulas, por sua vez, o percentual encontrado de 4X foi bem menor, sendo que nenhuma plântula foi detectada como octaploide (EZURA & OOSAWA, 1994).

Outros exemplos dos efeitos de diferentes reguladores no cultivo *in vitro* têm sido observados na literatura. Murata (1989) estudou os efeitos de três auxinas sintéticas na indução de trocas de segmentos entre cromátides irmãs (TCI), em trigo. Este autor verificou uma taxa significativa de trocas ao utilizar a auxina ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), quando comparada com 2,4-D e ANA, os quais também elevaram a taxa TCI. Damasco et al. (1998) indicaram que a concentração de citocinina usada no meio de multiplicação influenciou a produção de somatoclones de bananas do tipo anão. Outro exemplo é relatado por Ahmed et al. (2004), que observaram variação na morfologia das plantas, forma e cor das folhas, em regenerantes de *Caladium*, de acordo com o tipo e concentração do regulador utilizado.

Por outro lado, o número e duração de subcultivos também têm sido estudados como fontes que amplificam a taxa de variantes somaclonais, especialmente em suspensões celulares e cultura de calos (REUVENI & ISRAELI, 1990; BAIRU et al., 2006). Bairu et al. (2006) observaram uma variação de 72%, que pode ser explicada

pelo grande número de subcultivos, sendo 10 ciclos de geração o número máximo de subcultivos aceitos para multiplicação comercial de bananas. Côte et al. (2001) propuseram um modelo estatístico, no qual o percentual de VS pode ser calculado, de modo que este evento aumentará em função exponencial do número de ciclos de multiplicação (idade da cultura).

As modificações genéticas que podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* tornam a VS desvantajosa em processos clonais quando a ocorrência de variação espontânea descontrolada e aleatória é um fenômeno inesperado e, principalmente, indesejado (LARKIN, 1998; SAHIJRAM et al., 2003). No entanto, nem sempre essa variação é indesejada. A geração de variantes pela cultura de tecidos pode ser útil no melhoramento vegetal ao incluir características agronomicamente importantes (PATIL & NAVALE, 2000; JAIN, 2001; PREDIERI, 2001). Variações no nível de ploidia (PRADO et al., 2010), crescimento, produtividade, qualidade (HESZKY & KISS, 1992), pigmentação (ANU et al., 2004), resistências a doenças (BOBISUD et al., 1996) e resistência a diversas condições climáticas (ADKINS et al., 1995; MSIKITA et al., 1995) têm sido reportadas em diferentes espécies de plantas

1.1.2. Ultraestrutura de calos

O calo é uma proliferação de massa celular não organizada que precede a formação do embrião na ESI (GEORGE et al., 2008). Os tipos de calos estão relacionados com as diferentes capacidades para embriogênese somática, de acordo com as formas e características das células. Portanto, os calos podem ser divididos em embriogênicos (CE) e não-embriogênicos (CNE).

Os CE são compostos de massas proembriogênicas (PEMs) e suas células apresentam características comuns às células meristemáticas, como alta divisão celular (apesar de nem todos os sistemas apresentarem taxas altas), são isodiamétricas e de pequeno tamanho, possuem um citoplasma denso com vários grânulos de amido, núcleo grande e nucléolo proeminente, pequenos vacúolos e paredes celulares espessas (VASIL & VASIL, 1981; WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). O calo embriogênico, portanto, é macio, esbranquiçado e sua aparência apresenta protuberâncias. Já os calos não embriogênicos apresentam coloração amarelada a translúcida, aspecto encharcado, aparência dura à cristalina, são mais alongadas, largas e altamente vacuoladas. (NABORS et al., 1983).

Outra característica que distingue esses dois tipos de calos foi reportada por Chakrabarty et al. (2003), em relação ao nível de metilação do DNA. Níveis mais baixos de metilação do DNA foram encontrados em CE, em comparação a hipermetilação detectada em CNE de *Siberian ginseng*. Além disso, é possível observar uma organização interna em CE de arroz e milho, em diferentes estágios de desenvolvimento. Camadas externas consistiram de células meristemáticas, que deu origem a grupos de células embriogênicas e embriões somáticos; enquanto o interior dos calos consistiu de células parenquimáticas com um núcleo menos visível e muitos vacúolos. Algumas dessas células parenquimáticas se romperam e formaram espaços internos no calo (FRANSZ & SCHEL, 1991; VEGA et al., 2009).

Profumo et al. (1987) compararam as características estruturais de três tipos de calos de *Aesculus hippocastanum*, em que dois deles diferiram apenas no tempo de cultivo, sendo um derivado do outro. Os calos com 25 dias de cultivo apresentaram baixo crescimento, eram compactos e resistentes, havia numerosas mitocôndrias, mas com poucas cristas. Já os calos com mais de 25 dias de cultivo se tornaram amarelos, friáveis e apresentaram características embriogênicas, dictiossomas e retículos endoplasmáticos em proliferação, que estão relacionados com a síntese e excreção de enzimas líticas de paredes celulares responsáveis pelo desprendimento celular e consequentemente, a friabilidade.

1.2. Citometria de fluxo

Dentre as ferramentas utilizadas na identificação dos diferentes tipos de calos, a citometria de fluxo (CF) tem sido considerada uma ferramenta adequada para diferenciar calos embriogênicos e não-embriogênicos (KUBALÁKOVÁ et al., 1996; WINKELMANN et al., 1998; ZHANG et al., 2006), organogênicos e não organogênicos (KEVERS et al., 1999), ou ainda para detectar precocemente possíveis alterações no conteúdo de DNA das células dos calos (THIEM & ŚLIWIŃSKA, 2003; OCHATT, 2006).

1.2.1. Aspectos gerais

A CF determina indiretamente o conteúdo de DNA nuclear pelo mensuramento da emissão de fluorescência. Suspensões de núcleos e/ou células são coradas com fluorocromos DNA-específicos e a quantidade de luz emitida é quantificada (DOLEŽEL & BARTOŠ 2005).

O procedimento mais utilizado de CF é o *chopping*, que consiste em picotar uma pequena quantidade de tecidos da planta, principalmente folhas jovens, em um tampão apropriado para liberar os núcleos em suspensão (GALBRAITH et al., 1983). Várias modificações desse método possibilitam que a técnica seja aplicada em diferentes órgãos e tecidos vegetais (OCHATT, 2008). A facilidade para estimar o conteúdo de DNA estimulou várias áreas de aplicação, dentre elas a análise do ciclo celular (SANDOVAL et al., 2003) e da análise de ploidia (De LAAT et al., 1987; YANPAISAN et al., 1999).

Em plantas superiores, assim como em outros eucariontes, o crescimento e a divisão celular é um processo cíclico. No modelo de ciclo celular apresentado por Howard & Pelc (1986), o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em quatro fases: G₁, S, G₂ e M. Durante o período interfásico de crescimento celular (fase G₁) os núcleos com duas cópias do genoma não replicado possuem conteúdo 2C de DNA, sendo que o valor C, segundo Swift (1950), refere-se ao conteúdo de DNA de um complemento haploide de cromossomos. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear, e na fase seguinte (fase G₂) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 4C. Em seguida, inicia-se a mitose (fase M), durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA.

As fases do ciclo celular podem, então, ser monitoradas pela CF, uma vez que o DNA corado emitirá fluorescência relativa de seu conteúdo. Um histograma padrão conterá um pico dominante, que corresponde aos núcleos na fase G₀/G₁, um pico menor, que corresponde aos núcleos na fase G₂ e M, e entre esses dois picos uma distribuição de núcleos na fase S (GALBRAITH et al., 1983).

Outra aplicabilidade da CF é identificar o nível de ploidia. Para isso, compara-se a posição do pico G₁ no histograma de uma amostra com a posição do pico G₁ de uma planta padrão com ploidia conhecida, e avaliam-se os percentuais de células em cada pico (DOLEŽEL, 1997; GENDREAU et al., 1999). Outros dois parâmetros também podem ser utilizados para indicar o grau médio de endopoliploidização de um órgão ou tecido: a média do valor C (ENGELEN-EIGLES et al., 2000;

MISHIBA & MII, 2000) e o valor de ciclo (BAROW & MEISTER, 2003). Em plantas sem endopoliploidia, o pico 4C em órgãos completamente diferenciados, expandidos e maduros compreende cerca de 3% das células analisadas. Em função do baixo percentual desses núcleos, eles não devem ser considerados como resultado de endopoliploidização.

A análise por CF do conteúdo de DNA nuclear em células em intérfase é uma excelente alternativa aos métodos microscópicos clássicos de contagem cromossômica. Comparativamente, a CF apresenta as seguintes vantagens: é mais rápida (várias amostras podem ser analisadas em um único dia), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias (DOLEŽEL, 1997).

A CF tem sido utilizada para detectar variantes somaclonais em relação ao nível de ploidia, cujos resultados encontrados variam de acordo com o genótipo, explante e o sistema utilizado para induzir embriogênese. Prado et al. (2010) utilizaram embriões imaturos para induzir ES em *Vitis vinifera* e verificaram, a partir da avaliação citométrica em folhas das plantas regeneradas, a incidência de 28,57% de poliploidia em um dos genótipos testados; os demais apresentaram percentuais menores que 10%. Clarindo et al. (2008) reportaram que 14% das plântulas de *Carica papaya*, também obtidas via ES, mostraram diferentes heteroploidias de DNA: 5,6% de mixoploides, 4,3% triploides, 2% tetraploides e 2% aneuploides. Observa-se, portanto, que o nível de endopoliploidização *in vitro* varia entre as diferentes espécies e, até, entre diferentes genótipos; e a ferramenta CF se mostra adequada para este tipo de análise.

1.2.2. Aplicação da CF em calos

Alguns autores têm utilizado a CF para avaliar a competência da ES em células de calos, por meio da verificação da estabilidade genética das células. A competência para ES não está correlacionada significativamente com o nível de ploidia das células de CE e CNE (WINKELMANN et al., 1998; ZHANG et al., 2006). Contudo, em *Citrus*, o potencial para ES é genótipo dependente: apenas nove dos trinta e seis genótipos estudados mantiveram a competência após longos subcultivos (ZHANG et al., 2006).

Em CE de *Abies alba*, a maioria de suas células possuiu conteúdo de DNA 2C, apenas 3,1 – 7,6% das células tinham conteúdo 4C e praticamente nenhum núcleo foi detectado com valor acima de 4C. Os autores sugeriram, portanto, que não ocorreram mudanças do nível de ploidia durante a indução e cultivo de CE nessa espécie, demonstrando estabilidade cromossômica (GAJDOŠOVÁ et al., 1995).

Em *Cucumis sativus*, a ocorrência de células poliploides em CE, detectadas pela CF, explica a origem de regenerantes poliploides (KUBALÁKOVÁ et al., 1996). Nesse trabalho, 18% das plantas regeneradas de embriões somáticos foram tetraploides, 4% octaploides, 4% mixoploides do tipo diploide/tetraploide e 17% mixoploides do tipo tetraploide/octaploide. Os calos analisados foram poliploides e, em alguns, a ocorrência de células diploides foi completamente ausente. Tipicamente, os calos consistiram de 15% de células com conteúdo 2C, 45% com 4C, 35% com 8C e 5% de células com 16C ou mais. Uma provável origem das células endopoliploides nos calos se deve a ocorrência dessas células nos órgãos e tecidos do explante, como descrito por Gilissen et al. (1993) em pepino. Contudo, o embrião imaturo utilizado por Kubaláková et al. (1996) como explante continha apenas células diploides, indicando a indução de VS.

Coutos-Thevenot et al. (1990) relacionaram a capacidade embriogênica com o nível de ploidia de suspensões celulares advindas de microcalos de cenouras (*Daucus carota*). Uma de suas linhagens não embriogênicas foi tetraploide. No entanto, a tetraploidia não foi considerada a única razão para a ausência da capacidade embriogênica, pois outras linhagens não-embriogênicas foram completamente diploides.

A capacidade organogênica também foi avaliada por CF. Kevers et al. (1999) compararam o nível de ploidia de dois tipos de calos de *Beta vulgaris*, organogênicos e não-organogênicos. A análise feita pôde detectar que os calos organogênicos apresentaram o ciclo correspondente ao da folha diploide, enquanto os calos não organogênicos possuíam 3,3 e 3,6 vezes mais DNA do que o nível diploide, além do maior tamanho nuclear observado ao microscópio. Endomitoses ocorridas em calos não organogênicos são, provavelmente, a origem da poliploidização dessas células e subsequente perda de totipotencialidade.

1.3. Maracujá (*Passiflora cincinnata*)

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) é constituído de aproximadamente 400 espécies, distribuídas principalmente na América do Sul (AGUIAR-MENEZES et al., 2002), sendo que, no Brasil, existem mais de 150 espécies nativas. De todas as espécies, cerca de 50 a 60 são aproveitadas na alimentação humana. Entretanto, poucas são as espécies cultivadas ou com importância econômica, quer pela qualidade dos frutos, quer pela adaptabilidade como trepadeiras ornamentais ou propriedades medicinais. Dentre as espécies de maracujá cultivadas destacam-se *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. ligularis*, *P. mollissima* e *P. quadrangularis*.

Várias espécies selvagens de *Passiflora* têm chamado atenção em função do grande potencial para resistência a doenças e pestes. Dentre essas espécies, *Passiflora cincinnata* Masters tem sido usada como porta-enxerto por ser resistente à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae* e tolerante a nematoides (*Meloidogyne* sp.) (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005). *P. cincinnata* é uma espécie diploide com $2n = 2x = 18$ cromossomos (CUCO et al., 2005; SOUZA et al., 2008) e com 3,01 pg de DNA nuclear (PAIM PINTO et al., 2010).

P. cincinnata apresenta níveis seguros de respostas morfogênicas *in vitro* de acordo com a alta produção de gemas caulinares adventícias (VIEIRA & CARNEIRO, 2004; LOMBARDI et al., 2007; SILVA et al., 2011). *P. cincinnata* tem sido objeto de estudo sobre regeneração e fusão de protoplastos (DORNELAS & VIEIRA, 1993; VIEIRA & DORNELAS, 1996), indução de organogênese (LOMBARDI et al., 2007), regeneração a partir de embriões zigóticos e endosperma maduro (GUZZO et al., 2004), transformação genética (REIS et al., 2007) e indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros (SILVA et al., 2009, PAIM PINTO et al., 2010).

Paim Pinto et al. (2010) verificaram a estabilidade genética de plantas regeneradas via embriogênese primária e secundária de *P. cincinnata*, utilizando CF. Uma única planta regenerada de embriogênese primária apresentou mais que duas vezes o conteúdo total médio de DNA da espécie (6,21 pg).

Informações detalhadas sobre anatomia e ultraestrutura da ES a partir de embriões zigóticos maduros de *P. cincinnata* foram descritas por Rocha et al. (2011). Foi demonstrado que a proliferação meristemática das células da epiderme e mesófilo durante a diferenciação dos explantes cotiledonares não geraram embriões somáticos; ao contrário, protuberâncias foram geradas a partir de células do

parênquima e tecido vascular. Os mesmos autores também verificaram que a desdiferenciação das células periféricas das protuberâncias em pequenos grupos de células individualizadas indicam que embriões somáticos de *P. cincinnata* eram de origem multicelular.

Considerando que calos não são homogêneos em decorrência das diferentes condições do ambiente no qual são submetidos e que não há relatos na literatura sobre a aplicação da CF para verificar a existência dessa heterogeneidade quanto ao conteúdo de DNA (principalmente em relação à ploidia de DNA), o presente estudo propõe verificar se as heterogeneidades e a variação somaclonal ocorridas com o tempo de cultivo são regionalizadas em calos friáveis obtidos via ES. A espécie *Passiflora cincinnata* foi escolhida como modelo por apresentar respostas morfogênicas adequadas para a realização do estudo.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Visto que a variação somaclonal está relacionada com o processo de calogênese e com a influência dos reguladores de crescimento, e ainda, que a citometria de fluxo é uma ferramenta útil para detectar variações em calos, o presente trabalho tem como objetivo verificar a existência de heterogeneidade quanto à ploidia de DNA em calos, e se essa heterogeneidade é verticalmente regionalizada.

Objetivos específicos

- induzir embriogênese somática a partir de folhas cotiledonares de *P. cincinnata*;
- multiplicar o material a fim de se obter calos com diferentes tempos de cultivo e passíveis de serem monitorados pela CF;
- adaptar metodologia de CF para avaliar o nível de ploidia de DNA em calos;
- avaliar possíveis diferenças quanto ao nível de ploidia de DNA nas diferentes camadas (basal, intermediária e superior) de um mesmo calo;
- analisar a influência do tempo de cultivo e do número de subcultivos no surgimento de variação somaclonal, quanto ao nível de ploidia de DNA;
- avaliar, quando possível, o comportamento do ciclo celular das camadas, em relação aos percentuais de G₂/M.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

As sementes de *P. cincinnata* Masters (UFV.Bruck.PC-01) foram gentilmente fornecidas pelo setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. As culturas foram mantidas e as análises de citometria de fluxo, realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Germinação

Inicialmente, o tegumento das sementes foi removido com auxílio de uma mini-morsa (REIS, 2005). A amêndoa foi desinfestada em etanol 70% por 20 s, e em solução de desinfestação (água sanitária: água; na proporção 2:1) acrescida de Tween 20 a 0,01% (v/v) por 20 min, seguida de três enxágues em água deionizada autoclavada.

O meio de germinação conteve sais MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962, Sigma[®]), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 3 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma[®]). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,02, e 10 mL do meio foram vertidos em tubos de ensaio (REIS, 2005) e, posteriormente, autoclavados.

Sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, uma semente foi inoculada por tubo, e os tubos foram mantidos no escuro até a germinação, (aproximadamente 10 dias). Após, as culturas foram transferidas para sala de cultura sob irradiância de, cerca de, 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h para enverdecimento das folhas cotiledonares.

3.3. Indução de Embriogênese

O meio de indução de embriogênese foi utilizado conforme descrito por Silva et al. (2009), e a combinação dos reguladores de crescimento 2,4-D e BA escolhida foi a que resultou em maior produção de calos embriogênicos em embriões zigóticos de *Passiflora cincinnata* encontrada por esses autores. O meio basal (como descrito

para germinação) foi suplementado com 18,1 μM de 2,4-D, 4,5 μM de BA e 0,004 g L^{-1} de L-cisteína. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,02$ antes da autoclavagem. 15 mL deste meio foram vertidos em placas de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab[®], Brasil). As placas de Petri foram vedadas com filme PVC (Goodyear[®], Brasil) e mantidas no escuro a 25 ± 2 °C.

Folhas cotiledonares seccionadas transversalmente foram utilizadas como explantes e cinco explantes/placa foram inoculadas com a parte adaxial em contato com o meio. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. (25 ± 2 °C) e, a cada 60 dias, eram realizados subcultivos, nos quais os calos eram transferidos para novos meios de indução para proliferação da massa calosa.

Os calos foram classificados, de acordo com o tempo de cultivo, em: a) novos, os quais não foram recultivados e permaneceram dois meses no mesmo meio de cultura; b) intermediários, que permaneceram em meio de cultura por seis meses e foram recultivados três vezes; e c) velhos, cujo tempo de cultivo foi de nove meses e recultivados cinco vezes.

Cada calo foi seccionado, com a ajuda de um bisturi, em três camadas verticais (I, II, III) com, aproximadamente, a mesma espessura. A camada em contato com o meio foi classificada como basal (camada I), a camada superior e mais distante do meio de cultura foi classificada como topo (camada III) e a camada intermediária estava localizada entre as camadas I e III. Para os calos novos, a camada intermediária foi ausente e os calos foram divididos em apenas duas camadas (basal e superior, I e II).

3.4. Citometria de Fluxo

Procedimentos de isolamento de núcleos de calos foram testados a fim de se obter suspensões nucleares, minimizando a quantidade de debris citoplasmáticos e preservando a estrutura e morfologia nuclear de maneira a possibilitar análises com coeficientes de variação (CV) adequados para esse tipo de análise.

Vinte calos de cada um dos três tipos (novo, intermediário e velho) foram utilizados para analisar as suas diferentes camadas, totalizando 60 calos. Como cada calo novo foi dividido em duas camadas, e cada calo intermediário e velho, em três camadas, 160 análises foram realizadas, no total. Aproximadamente, 0,1 g de calo de cada camada foi utilizado.

A suspensão nuclear foi obtida pelo procedimento de *chopping* (GALBRAITH et al., 1983) e a metodologia adaptada de Carvalho et al. (2008). Foram utilizados os tampões CyStain UV Precise P, da Partec[®] (High Resolution DNA Staining Kit). O *chopping* de cada calo foi realizado em 0,5 mL de solução tampão de extração nuclear do kit, em placas de Petri. Após 5 min, foram utilizados 0,5 mL da mesma solução para lavagem da placa e a suspensão foi filtrada em filtros de nylon (Partec[®]) de 30 µm de diâmetro, em tubos Eppendorf[®] de 2 mL. Os tubos foram, então, centrifugados a 100 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, 100 µL do tampão de extração foram adicionados e, após vortex, foram incubados durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, 1,5 mL de tampão de coloração do kit contendo o fluorocromo 4'6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) foram adicionados.

Decorridos 30 min no escuro, as suspensões nucleares foram passadas em filtro de nylon de 20 µm nos tubos de leitura e analisadas em um citômetro de fluxo Partec-PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipado com uma lâmpada UV e um filtro TK 420. O equipamento foi cuidadosamente calibrado e alinhado pelo uso de *microbeads*, soluções padrão, de acordo com as recomendações do fabricante.

As análises foram divididas em etapas, sendo que, em cada uma, 40 amostras foram realizadas. Para determinar a posição do pico 2C padrão, folhas jovens de plantas de *P. cinnamata* germinadas *in vitro* foram analisadas juntamente com cada etapa.

Os histogramas foram analisados em escala semi-logarítmica (log no eixo x). Neste caso, o número do canal é proporcional ao log da intensidade de emissão de fluorescência, e as ploidias de DNA foram determinadas pelos valores múltiplos do pico diploide padrão.

Para verificar qual a camada mais proliferativa entre os calos novos, foi realizado o teste estatístico t de Student para amostras dependentes, com 5% de probabilidade. O percentual médio de células em G₂/M foi utilizado nessa análise, portanto, foi possível realizar o teste apenas em calos diploides.

4. RESULTADOS

Calos embriogênicos foram obtidos a partir da cultura de folhas cotiledonares de *P. cincinnata* em meio MS suplementado com as concentrações descritas por Silva et al. (2009) de 18,1 μM de 2,4-D e 4,4 μM de BA. Após 30 dias de cultura, calos primários foram formados. Inicialmente, os calos apresentaram coloração amarelo-esbranquiçada e se tornou amarelo-pardo com aspecto friável após 60 dias de cultivo. Pôde-se observar que a utilização de folhas cotiledonares apresentou resposta embriogênica, pois com aproximadamente 90 dias de cultivo, ainda em meio de indução, células se diferenciaram em embriões, conforme a Figura 1a. Os subcultivos foram eficientes para proliferação e obtenção de grande quantidade de calos que puderam ser analisados por CF. Os calos com diferentes tempos de cultivo obtidos estão representados nas Figuras 1b, 1c e 1d.

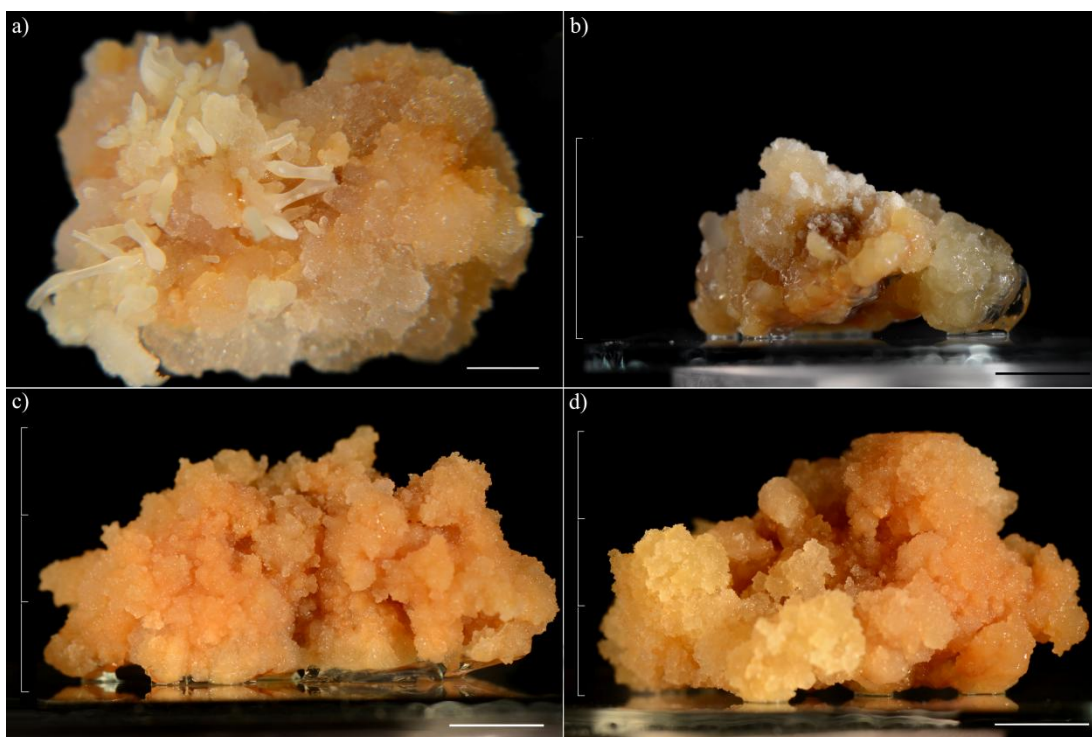


Figura 1: Calos de *Passiflora cincinnata* obtidos de folhas cotiledonares induzidas a ES. a) calo com aproximadamente 90 dias e com embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento; b) calo novo, com 2 meses de cultivo; c) calo intermediário com 6 meses de cultivo; e d) calo velho com 9 meses. Escalas laterais em b, c e d indicam onde os cortes foram realizados, sendo que a camada basal (I) está em contato com o meio, a camada intermediária (II) está entre as outras duas camadas e a camada (III) é a mais superior. Note que a altura do calo novo não possibilitou os dois cortes. Barra = 5 mm.

Nas análises de CF, foram obtidos CV's entre 4,7 e 6,5%. As suspensões nucleares obtidas de protocolos adaptados de CF apresentaram núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Os valores de núcleos analisados para cada tipo de calo variou de 4.500 a 10.000 em calos novos, de 4.500 a 7.000 em calos intermediários e de 4.500 a 5.500 em calos velhos. Foi possível avaliar todos os calos novos e intermediários e, em apenas um calo classificado com velho, não foram detectadas populações nucleares. Observaram-se seis tipos diferentes de ploidias e multiploidias distribuídas nas camadas. Células diploides (2C), tetraploides (4C), multiploides do tipo diploide/tetraploide (2C/4C), tetraploide/octaploide (4C/8C), diploide/tetraploide/hexaploide (2C/4C/6C) e diploide/tetraploide/octaploide (2C/4C/8C) foram identificados. Histogramas representativos de cada um desses níveis podem ser visualizados nas Figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e e 3f, respectivamente. Os calos multiploides foram considerados do tipo mosaico, em decorrência do explante ter sido originado a partir de apenas um zigoto.

As camadas dos 59 calos foram analisadas para verificar se existia ou não homogeneidade entre elas quanto ao nível de ploidia de DNA apresentado. Na Figura 3, é possível observar que 17, 5 e 7 calos foram homogêneos e 3, 15 e 12 foram heterogêneos para os calos classificados como novos, intermediários e velhos, respectivamente. Nos calos novos, os quais foram seccionados em apenas duas camadas, 85% foram homogêneos, pois, apresentaram picos correspondentes ao conteúdo diploide da espécie, tanto na camada I como na II. No entanto, para os calos intermediários, 75% deles foram heterogêneos, apresentando pelo menos uma camada com ploidia diferente das demais. Já para os calos velhos, houve um aumento com relação ao número de calos homogêneos, sendo que 37% deles apresentaram as mesmas ploidias nas três camadas (Tabela 1). Três dos cinco calos homogêneos apresentaram conteúdo duplicado (4C) de DNA, sendo que o pico referente ao conteúdo 2C de DNA foi ausente nas três camadas. A homogeneidade aumentou, contudo as células desses calos se tornaram tetraploides.

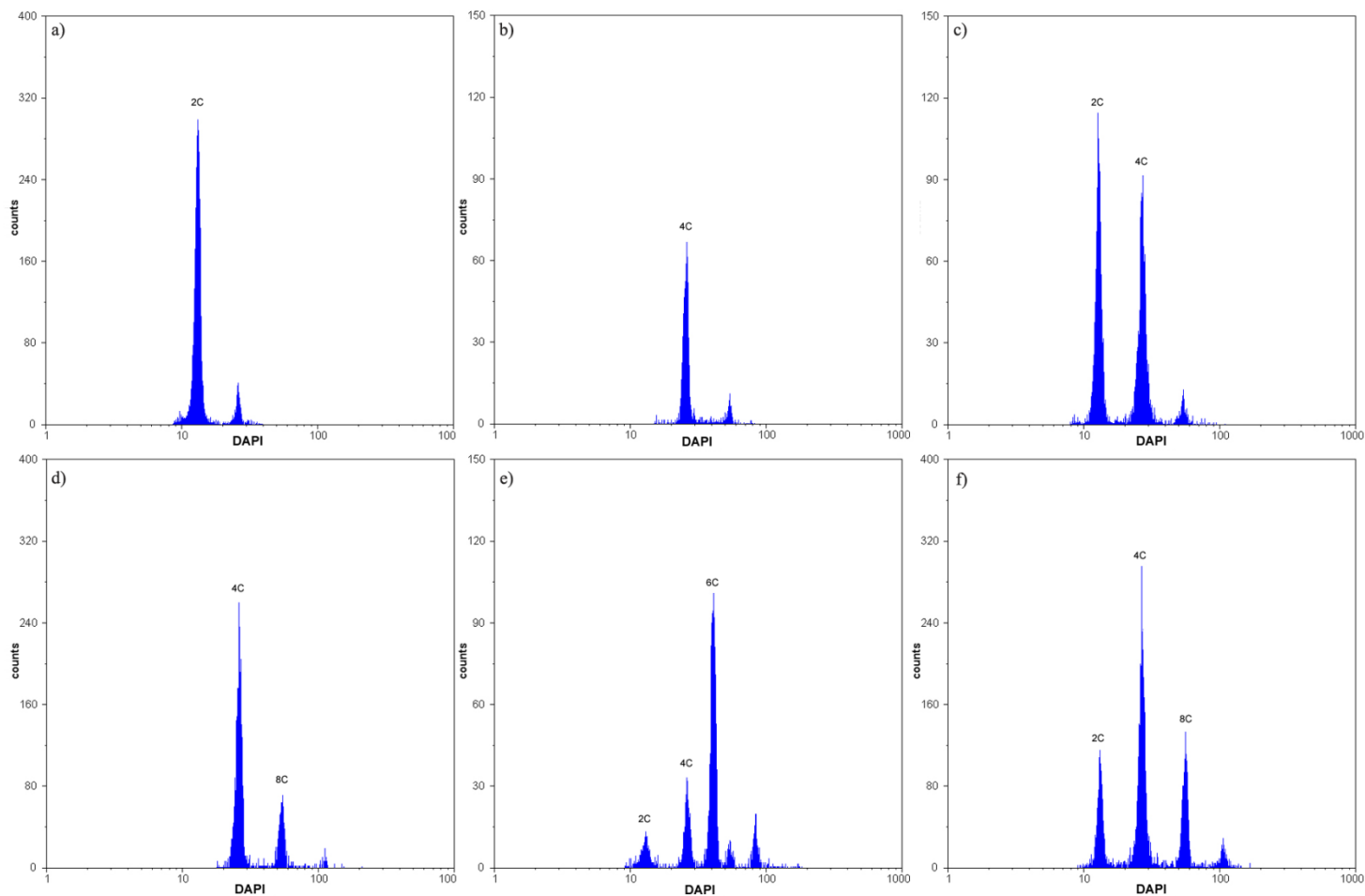


Figura 2: Histogramas citométricos de fluxo em escala semi-logarítmica de núcleos corados com DAPI, de *Passiflora cincinnata*. Histograma representativo de camadas: a) 2C (pico G_0/G_1 no canal 13); b) 4C (canal 26); c) 2C/4C (canais 13 e 26); d) 4C/8C (canais 26 e 53); e) 2C/4C/6C (canais 13, 26, 41); e f) 2C/4C/8C (canais 13, 27 e 55). Os picos menores sem identificação representam o G_2/M de seus respectivos picos G_0/G_1 .

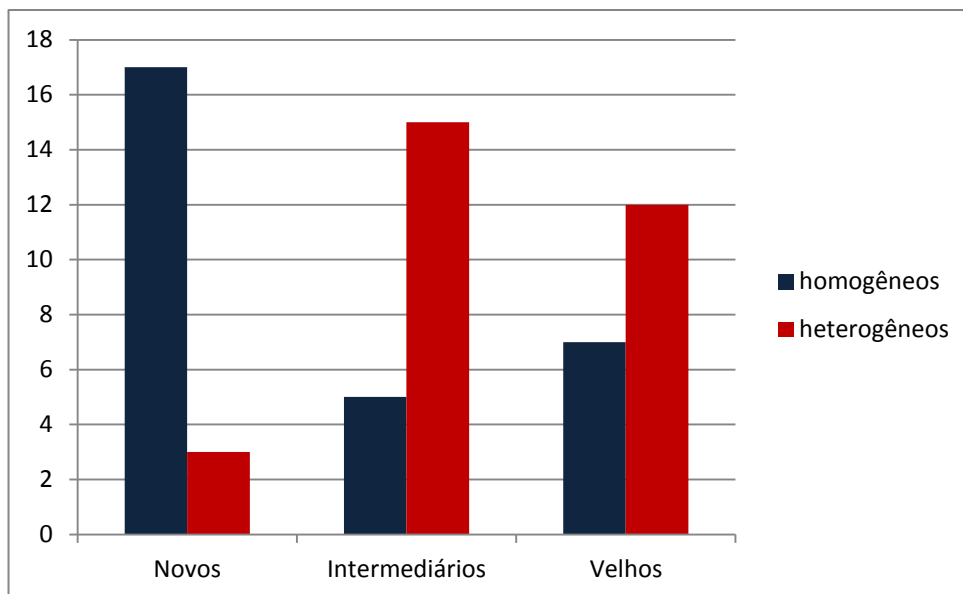


Figura 3: Distribuição dos números observados de calos homogêneos e heterogêneos entre os diferentes tipos de calos (novos, intermediários e velhos).

As ploidias de DNA detectadas nas camadas dos três tipos de calo, assim como o número observado para cada nível de ploidia foram sumarizados nas Tabelas 1, 2 e 3. A Tabela 1 mostra que foram detectados três diferentes níveis de ploidia nas camadas dos calos novos: diploides e multiploides ($2C/4C$ e $2C/4C/8C$), diferentemente das camadas dos calos intermediários e velhos, que foram divididas em cinco classes. Para os calos intermediários (Tabela 2), as ploidias de DNA $2C$, $2C/4C$, $2C/4C/8C$, $2C/4C/6C$ e $4C$ foram encontradas, dos quais apenas o nível $2C/4C/6C$ não foi observado em calos velhos (Tabela 3), mas o nível $4C/8C$ foi detectado apenas nesse tipo de calo.

Para os calos intermediários (Tabela 2), vale ressaltar que, na camada superior (camada III), foram detectadas mais células diploides nos diferentes calos analisados, enquanto que, na camada mais próxima do meio de cultura (camada I), há células com o dobro do conteúdo de DNA, sendo que a multiploidia do tipo $2C/4C$ foi encontrada em oito calos diferentes e foi a que mais se repetiu na camada I.

Entre os três tipos de calos, verificou-se um aumento do número de camadas com ploidias de DNA mais altas conforme o tempo de cultivo aumentou. Em calos novos, apenas um multiploide do tipo $2C/4C/8C$ foi verificado. Para calos intermediários, a quantidade de calos com essa multiploidia passou para quatorze, além de uma camada ser do tipo $2C/4C/6C$ e uma camada ser apenas tetraploide. No

entanto, em calos velhos, o número de tetraploides passou para quinze, e surgiram sete camadas do tipo 4C/8C, enquanto o nível 2C/4C/8C foi detectado em nove camadas.

Tabela 1: Distribuição do número de camadas por tipo e em relação ao seu nível de ploidia de DNA, em calos novos.

Camadas (Tipo)	Ploidia de DNA			Total
	2C	2C/4C	2C/4C/8C	
II (superior)	17	2	1	20
I (basal)	20	0	0	20

Tabela 2: Distribuição do número de camadas por tipo e em relação ao seu nível de ploidia de DNA, em calos intermediários.

Camadas	Ploidia de DNA					Total
	2C	2C/4C	2C/4C/8C	2C/4C/6C	4C	
III (superior)	11	5	3	0	1	20
II (intermediária)	9	6	4	1	0	20
I (basal)	4	8	7	1	0	20

Tabela 3: Distribuição do número de camadas por tipo e em relação ao seu nível de ploidia de DNA, em calos velhos.

Camadas	Ploidia de DNA					Total
	2C	2C/4C	2C/4C/8C	4C	4C/8C	
III (superior)	4	3	3	5	4	19
II (intermediária)	6	4	2	5	2	19
I (basal)	4	5	4	5	1	19

A partir da análise comparativa entre os percentuais de células em G₂/M das camadas I e II dos calos novos, foi possível identificar a camada mais proliferativa. Apenas em calos novos foi estabelecida essa comparação, pois esse tipo foi o mais homogêneo, apresentando células diploides em ambas as camadas. A camada I apresentou média do percentual de G₂ (18,52%) superior ao da camada II (13,75%), pelo teste t de Student para duas amostras dependentes. Os percentuais de células em G₀/G₁ e G₂/M de cada camada podem ser visualizados na Figura 4. Os calos

heterogêneos (P, Q e S) foram descartados para essa análise, pois apresentaram multiploidias nas camadas II. Maior percentual de células em G_2/M na camada I também pôde ser verificado nos calos homogêneos intermediários, em que as três camadas foram diploides (dados não mostrados).

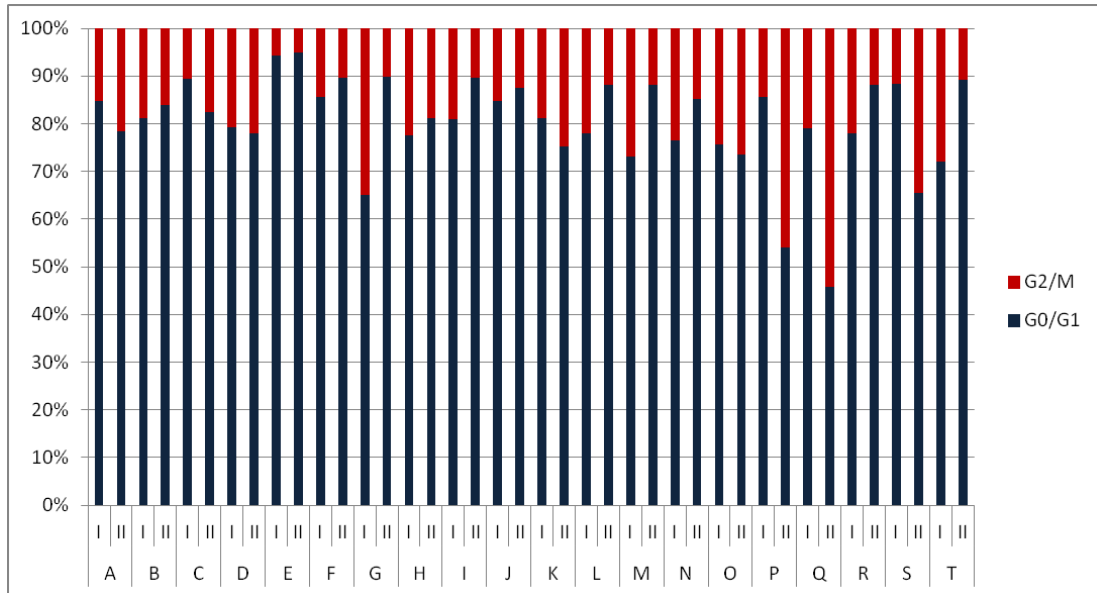


Figura 4: Distribuição dos percentuais de células em G_0/G_1 e G_2/M nas duas camadas (I e II) dos calos novos. Os calos P, Q e S são multiploides e foram desconsiderados na análise estatística.

5. DISCUSSÃO

As folhas cotiledonares de *P. cinnamomum*, utilizadas como explante para induzir ES, apresentaram 100% de resposta embriogênica para o meio de cultura utilizado. No entanto, Silva et al. (2009), Paim Pinto et al. (2010) e Rocha et al. (2011) induziram ES nessa espécie, utilizando embriões zigóticos maduros como explante, em meio contendo os mesmos componentes. As folhas cotiledonares foram escolhidas ao invés de embriões zigóticos, pois a extração destes é mais laboriosa quando comparada com a obtenção das folhas. A utilização de folhas cotiledonares para induzir ES tem sido reportada com sucesso em vários sistemas, como *Carthamus tinctorius* (MANDAL & GUPTA, 2003), *Lactuca sativa* (PINHEIRO et al., 2012 *in prelo*) e *Clitoria ternatea* (KUMAR & THOMAS, 2012).

As mudanças morfológicas que ocorreram entre os calos novos e velhos corroboraram com os resultados de Profumo et al. (1987). Os calos cultivados há mais tempo no mesmo meio adquiriram características de calos friáveis quando comparados com os calos mais novos, que apresentaram cores esbranquiçadas e aspecto mais compacto. Possivelmente, mais tempo de cultivo *in vitro* seja necessário para aquisição das características de células embriogênicas.

O protocolo de CF para extração dos núcleos de calos foi considerado adequado para a análise de ploidias das camadas, em decorrência do número suficiente de núcleos analisados (4.500 a 10.000) e CV's obtidos (4,5 – 6,5%). Segundo Doležel & Bartoš (2005), CV's acima de 5% não são considerados aceitáveis em estudos de CF vegetal. No entanto, os valores acima de 5% encontrados no presente estudo estão relacionados com a heterogeneidade celular do material analisado.

Considerando a análise comparativa realizada entre os três tipos de calo, diferentes quantidades de núcleos foram analisadas em função da idade do material. Apesar de ter sido utilizado o mesmo procedimento de extração de núcleos para os três tipos de calo, a obtenção de núcleos em maior quantidade foi mais facilmente atingida em calos novos do que nos velhos. Verificou-se que, para alcançar um valor aceitável de núcleos analisados pelo citômetro, foi necessário um tempo maior de processamento das suspensões nucleares em calos velhos e tempo menor em calos novos. Šamaj et al. (2006) apresentam as características estruturais específicas das células embriogênicas relacionadas à composição de sua parede celular e arranjos do

citoesqueleto. Tais mudanças devem acontecer com o envelhecimento do calo, o que impossibilitaria que os procedimentos de isolamento de núcleos fossem igualmente eficazes.

A partir da análise dos histogramas, pôde-se afirmar a existência de heterogeneidade quanto às diferentes ploidias de DNA em um mesmo calo, assim como uma variabilidade existente entre os calos mais novos e mais velhos quanto ao surgimento de novas ploidias de DNA e multiploidias, conforme o tempo de cultivo foi aumentando; também pôde-se inferir sobre a camada mais proliferativa em calos homogêneos. 75% e 63% dos calos intermediários e velhos, respectivamente, apresentaram heterogeneidade. A heterogeneidade é esperada durante a calogênese, em decorrência das diferenças do microambiente no qual o calo é exposto (WANG & WANG, 2012). Entretanto, essas possíveis diferenças não haviam sido descritas na literatura. Alguns autores relacionam o conteúdo de DNA dos calos com sua competência embriogênica/organogênica (KUBALÁKOVÁ et al., 1996; WINKELMANN et al., 1998; KEVERS et al., (1999); ZHANG et al., 2006). Por exemplo, Makowczyńska et al. (2008) sugerem que, se existe diferença significativa entre o valor 2C dos calos e da folha padrão, isso indica falta de competência organogênica do calo, e também que o mensuramento do conteúdo de DNA por CF pode ser útil na triagem dos calos durante o cultivo *in vitro* das espécies. Contudo, o presente estudo demonstrou haver heterogeneidade vertical do conteúdo de DNA de calos, ou seja, os resultados dependem da região utilizada para a realização dos procedimentos de CF. Sendo assim, não é possível considerar uma parte como um todo para inferir sobre suas competências.

O tempo de cultivo prolongado explicaria o aumento do percentual de calos homogêneos em calos mais velhos. Esses calos, que foram considerados homogêneos, apresentaram conteúdo de DNA duplicado, indicando que o tempo de exposição ao meio com 2,4-D e BA estaria induzindo o surgimento da ploidia em todas as três camadas. Song et al. (2000), Yang et al. (2000), Hao & Deng (2002) e Zhang et al. (2006) são alguns autores que reportaram aumento das variações cromossômicas ao longo dos subcultivos.

A evidência indicativa de que os altos níveis de ploidias de DNA foram induzidos pela cultura de tecidos refere-se aos valores similares de conteúdo de DNA encontrados em folhas e calos novos. As ploidias mais altas foram detectadas, principalmente, na camada basal dos calos intermediários, na qual o explante está em

contato direto com o meio de cultura. Os eventos de endopoliploidização, que geraram as diferentes ploidias encontradas no presente trabalho, devem estar relacionados à concentração relativamente alta utilizada do regulador 2,4-D (18,1 μM ou 4 mg L^{-1}). A concentração a ser utilizada depende da espécie e do explante escolhidos para indução. Em *Brassica oleracea*, a concentração de 0,05 e 0,1 mg L^{-1} de 2,4-D foi suficiente para induzir a ES (SIONG et al., 2011); em *Clitoria ternatea*, 2,0 mg L^{-1} (KUMAR & THOMAS, 2012); em *Panicum virgatum*, 5,0 mg L^{-1} (BURRIS et al., 2009); e para soja esse valor passa para 40,0 mg L^{-1} (CHOI et al., 2010). A possível capacidade para induzir poliploidias pelo 2,4-D verificada no presente estudo corrobora com Ziauddin & Kasha (1990), Liscum & Hangarter (1991) e Mishiba et al. (2001), os quais reportaram anormalidades cromossômicas decorrentes da utilização de 2,4-D no meio de cultivo.

Mishiba et al. (2001) sugerem que células com menores ploidias são mais sensíveis ao efeito tóxico do 2,4-D do que células com ploidias maiores. Isso explicaria o surgimento de mais camadas com células apresentando conteúdo de DNA duplicado (4C e 4C/8C) e ausência de células com conteúdo diploide em calos velhos, cujo tempo de exposição ao 2,4-D foi maior. Esses autores verificaram ainda o aumento da proporção de células 8C durante seis dias e a não ocorrência de valores maiores do conteúdo de DNA para as diferentes concentrações de 2,4-D testadas (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L^{-1}). O conhecimento do efeito dos reguladores de crescimento de plantas na endoreduplicação é útil na manutenção do nível de ploidia das plantas cultivadas *in vitro* (LIM & LOH, 2003).

Padmanabhan et al. (2001) também observaram diferenças entre calos novos e velhos. Calos mais novos foram altamente embriogênicos e deram origem a maior número de embriões competentes em batata doce, enquanto que, nas linhas que foram expostas repetidamente ao 2,4-D, houve o acúmulo desse hormônio e de seus metabólitos nos calos, e os embriões foram amplamente não competentes para conversão em plantas.

O surgimento de células com conteúdo 6C de DNA (Figura 2e) ocorreu, provavelmente, por duplicação de células do endosperma que foram carregadas juntamente com as folhas cotiledonares utilizadas para induzir ES. O surgimento desta ploidia está relacionado com a utilização do endosperma como explante (BORCHERT et al., 2007). A fusão nuclear entre núcleos 2C e 4C seria outra

hipótese, porém esse mecanismo tem sido proposto mais comumente para as altas ploidias encontradas na androgênese (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2008).

As camadas em contato com o meio de cultivo foram mais proliferativas do que as camadas superiores em calos novos, indicando que o contato com o meio está contribuindo para as divisões celulares ocorrerem. Esse fato está relacionado com o requerimento, pelas células vegetais, de reguladores de crescimento exógenos, como auxinas e citocininas, para sustentar a divisão celular (FEHÉR et al., 2003). Essa proliferação mais alta pode estar relacionada também com a indução de multiploidias que aparecem nas camadas I dos calos intermediários e velhos. Nesses mesmos calos, foram detectados apenas quatro calos diploides na camada I.

Células com alterações genéticas apresentam diminuição da sua taxa de crescimento e da sua capacidade de multiplicação (FRANKLIN et al., 1989; GAPONENKO et al., 1988; WANG et al., 1992), isso explicaria a menor quantidade de núcleos obtidos em calos velhos. O material velho esteve mais tempo em contato com o meio de cultura e apresentou células com conteúdo de DNA duplicado, além de, possivelmente, ter ocorrido outras variações induzidas. Portanto, o ciclo celular dessas células alteradas pode não ter sido identificado pela CF, e essa ferramenta poderia ser considerada útil para detectar a viabilidade celular.

6. CONCLUSÃO

A indução de ES a partir de folhas cotiledonares de *P. cincinnata* foi descrita pela primeira vez no presente trabalho e foi considerada apropriada para a produção de calos friáveis e com características embriogênicas.

Concluiu-se, no presente estudo, que a CF é uma ferramenta eficaz para detecção de variações somaclonais ainda em estágio de calo e a metodologia foi considerada confiável para análise de ploidia nas diferentes camadas dos calos. Com isso, foi possível verificar que há heterogeneidade verticalmente regionalizada quanto aos níveis de ploidias de DNA em três tipos de calo de diferentes idades. Sugere-se, portanto, que não se pode inferir sobre a qualidade do calo com base no seu conteúdo de DNA, já que as diferentes partes do calo apresentam distintas ploidias e multiploidias, de acordo com a influência que sofre do meio de cultivo.

O cultivo prolongado influenciou o surgimento de novos níveis de ploidias de DNA, e níveis mais altos (6C, 8C). Para essa espécie, pode-se indicar que as culturas fossem realizadas em períodos mais curtos de tempo, quando o objetivo for clonagem do material, para evitar que embriões se formem a partir de células alteradas.

Como foi verificado no presente trabalho, houve diminuição dos núcleos analisados pelo citômetro, conforme os calos foram envelhecendo, essa redução pode indicar perda da viabilidade celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S.W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GODWIN, I.D. Somaclonal variation in rice - drought tolerance and other agronomic characters. **Australian Journal of Botany**, v.43, p.201–209, 1995.

AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B.; CASSINO, P.C.R.; SOARCES M.A. Passion fruit. In: PEÒA, J.E.; SHARP, J.L.; WYSOKI, M. (Eds.). **Tropical fruit pests and pollinators**, CAB International, 2002, p. 361- 390.

AHMED, E.U.; HAYASHI, T.; YAZAWA, S. Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v.100, p.153-159, 2004.

ANU, A.; BABU, K.N.; PETER, K.V. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.261-267, 2004.

BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; STADEN, S. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v.63, p.147-173, 2011.

BAIRU, M.W.; FENNELL, C.W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. ‘Zelig’). **Scientia Horticulturae**, v.108, p.347–351, 2006.

BARLOW, P.W. Endopolyploidy: Towards an understanding of its biological significance. **Acta Biotheoretica**, v.27, p.1-18, 1978.

BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant, Cell & Environment**, v.26, p.571-584, 2003.

BAYLISS, M.W. The effects of growth in vitro on the chromosome complement of *Daucus carota* (L.) suspension cultures. **Chromosoma**, v.51, p.401–411, 1975.

BENNICI, A.; ANDIZEI, M.; VENDRAMIN, G.G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.166, p.221-227, 2004.

BOBISUD, C.A.; MARTIN, S.P.; SEKIOKA, T.T. Field testing bacterial wilt-resistant tomato somaclones. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.121, p.384–387, 1996.

BORCHERT, T.; FUCHS, J.; WINKELMANN, T.; HOHE, A. Variable DNA content of *Cyclamen persicum*; regenerated via somatic embryogenesis: rethinking the concept of long-term callus and suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, p.255-263, 2007.

BURRIS, J.; MANN, D.; JOYCE, B.; STEWART, C. An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **BioEnergy Research**, v.2, p.267-274, 2009.

CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; PRAÇA, M.M.; ARAÚJO, F.S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, v.174, p.613-617, 2008.

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). **Plant Science**, v.165, p.61-68, 2003.

CHOI, P.; MANO, Y.; ISHIKAWA, A.; ODASHIMA, M.; UMEZAWA, T.; FUJIMURA, T.; TAKAHATA, Y.; KOMATSUDA, T. Identification of QTLs controlling somatic embryogenesis using RI population of cultivar x weedy soybean. **Plant Biotechnology Reports**, v.4, p.23-27, 2010.

CHOI, Y.E.; YANG, D.C.; PARK, J.C.; SOH, W.Y.; CHOI, K.T. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Reports**, v.17, p.544-551, 1998.

CLARINDO, W.; DE CARVALHO, C.; ARAÚJO, F.; DE ABREU, I.; OTONI, W. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.92, p.207-214, 2008.

COLIJN-HOOYMANS, C.M.; HAKKERT, J.C.; JANSEN, J.; CUSTERS, J.B.M. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p.211-217, 1994.

CÔTE, F.; TEISSON, C.; PERRIER, X. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: Contribution to understanding through a statistical approach. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.37, p.539-542, 2001.

COUTOS-THEVENOT, P.; JOUANNEAU, J.P.; BROWN, S.; PETIARD, V.; GUERN, J. Embryogenic and non-embryogenic cell lines of *Daucus carota* cloned from meristematic cell clusters: relation with cell ploidy determined by flow cytometry. **Plant Cell Reports**, v.8, p.605-608, 1990.

CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v.58, p. 220–228, 2005.

DAMASCO, O.P.; ADKINS, S.W.; GODWIN, I.D.; SMITH, M.K. Use of a scar-based marker for the early detection of dwarf off-types in micropropagated cavendish bananas. **Acta Horticulturae. (ISHS)**, v. 461, p.157-164, 1998.

D'AMATO, F.; BAYLISS, M.W. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.3, p.73-112, 1985.

De LAAT, A.M.M.; GÖHDE, W.; VOGELZANG, M.J.D. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. **Plant Breeding**, v.99, p.303–307, 1987.

DEO, P.C.; TYAGI, A.P.; TAYLOR, M.; HARDING, R.; BECKER, D. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v.28, p.27-40, 2010.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Review article. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1493-1509, 1997.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v.38, p.285-302, 1997.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J.A.N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v.95, p.99–110, 2005.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. *P. amethystine* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103–106, 1993.

DUDITS, D.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells. **Journal of Cell Science**, v.99, p.475–484, 1991.

ENGELEN-EIGLES, G.; JONES, R.J.; PHILLIPS, R.L. DNA endoreduplication in maize endosperm cells: the effect of exposure to short-term high temperature. **Plant, Cell & Environment**, v.23, p.657-663, 2000.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**, Academic Press, New York, 1981, p. 45-113.

EZURA, H.; OOSAWA, K. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Reports**, v.14, p.107-111, 1994.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FRANKLIN, C.I.; MOTT, R.L.; VUKE, T.M. Stable ploidy levels in long-term callus cultures of loblolly pine. **Plant Cell Reports**, v.8, p.101-104, 1989.

FRANSZ, P.F.; SCHEL, J.H.N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**. v.69, p.26-33, 1991.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

GAJDOŠOVÁ, A.; VOOKOVÁ, B.; KORMUŤÁK, A.; LIBIAKOVÁ, G.; DOLEŽEL, J. Induction, protein composition and DNA ploidy level of embryogenic calli of silver fir and its hybrids. **Biologia Plantarum**, v.37, p.169-176, 1995.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.R.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIRROZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v.220, p.1049–1051, 1983.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GAPONENKO, A.K.; PETROVA, T.F.; ISKAKOV, A.R.; SOZINOV, A.A. Cytogenetics of in vitro cultured somatic cells and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.905-911, 1988.

GENDREAU, E.; ORBOVIC, V.; HÖFTE, H.; TRAAS, J. Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. **Planta**, v.209, p.513-516, 1999.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology. London: Exegetics Ltd., 1993, p.285-291.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J.D. Plant Tissue Culture Procedure – Background Plant Propagation by Tissue Culture. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J.D. (Ed.). Springer Netherlands, 2008, p.1-28.

GILISSEN, L.J.W.; VAN STAVEREN, M.J.; CREEMERS-MOLENAAR, J.; VERHOEVEN, H.A. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. **Plant Science**, v.91, p.171-179, 1993.

GILISSEN, L.J.W.; VAN STAVEREN, M.J.; HAKKERT, J.C.; SMULDERS, M.J.M.; VERHOEVEN, H.A.; CREEMERS-MOLENAAR, J. The competence of cells for cell division and regeneration in tobacco explants depends on cellular location, cell cycle phase and ploidy level. **Plant Science**, v.103, p.81-91, 1994.

GOLDSWORTHY, A.; MINA, M.G. Electrical patterns of tobacco cells in media containing indole-3-acetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Planta**, v.183, p.368-373, 1991.

GRAY, D.J.; PUROHIT, A.; TRIGLANO, R.N. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p.33-61, 1991.

GROSSMANN, K. Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. **Trends in Plant Science**, v.5, p.506-8, 2000.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B.. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas v.2**. Brasília, Embrapa-CBAB. 1999, p. 533-568.

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

HACCIUS, B. Questions of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74–81, 1978.

HAO, Y.-J.; DENG, X.-X. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.38, p.472-476, 2002.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. Plant propagation: principles and practices. 4th Edition. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall, 1983, 928 p.

HESZKY, L.E.; KISS, E. ‘Dama’, the first plant variety of biotechnology origin in Hungary, registered in 1992. **Hungarian Agricultural Research**, v.1, p.30–32, 1992.

HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. **International Journal of Radiation Biology**, v.49, p.207-218, 1986.

JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.

JOUBÈS, J.; CHEVALIER, C. Endoreduplication in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.735-745, 2000.

KAMADA, H.; ISHIKAWA, K.; SAGA, H.; HARADA, H. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. **Plant Tissue Culture Letters**, v.10, p.38–44, 1993.

KARP, A. Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *International Plant Tissue Culture Association Newsletter*, v.58, p.2–11, 1989.

KASHA, K.J: Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: PALMER, C.E.; KELLER, W.A.; KASHA, K.J. (Eds.). **Haploids in Crop Improvement II Vol**, Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005, p. 123–152.

KEVERS, C.; GREIMERS, R.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Flow cytometry estimation of nuclear size and ploidy level of habituated calli of sugar beet. **Biologia Plantarum**, v.42, p.321-332, 1999.

KUBALÁKOVÁ, M.; DOLEŽEL, J.; LEBEDA, A. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. **Biologia Plantarum**, v.38, p.475-480, 1996.

KUMAR, G.K.; THOMAS, T. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.141-151, 2012.

KUNITAKE, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and its application for breeding and micropropagation in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Biotechnology**, v.12, p.51-61, 1998.

LARKIN, P.J. Introduction. In: JAIN, S.M.; BRAR, D.S.; AHLOOWALIA, B.S. (Eds.) **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998, p 3–13.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and applied genetics**, v.60, p.197-214, 1981.

LIM, W.L.; LOH, C.S. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). **New Phytologist**, v.159, p.279-287, 2003.

LISCUM, E.; HANGARTER, R.P. Manipulation of Ploidy Level in Cultured Haploid Petunia Tissue by Phytohormone Treatments. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.33-38, 1991.

LO SCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.325-331, 1989.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZATO-DA-GLÓRIA, B. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology Biotechnoly**, v.50, p.239–247, 2007.

MAKOWCZYŃSKA, J.; ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E.; ŚLIWIŃSKA, E. Nuclear DNA content in different plant materials of *Plantago asiatica* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.94, p.65-71, 2008.

MANDAL, A.K.A.; DUTTA GUPTA, S. Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.27-31, 2003.

MISHIBA, K.-I.; MII, M. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandiflora*. **Plant Science**, v.156, p.213-219, 2000.

MISHIBA, K.-I.; OKAMOTO, T.; MII, M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiologia Plantarum**, v.112, p.142-148, 2001.

MOORE, T. Auxins. In: MOORE, T. (Ed.) **Biochemistry and physiology of plant hormones**. 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 1989, p.28-93.

MSIKITA, W.; WILKINSON, H.T.; DIAS, J.C.S. Variation for black rot resistance in trichuda regenerated from epicotyl segments. **HortScience**, v.30, p.1298–1301, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

MURATA, M. Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.521–524, 1989.

NABORS, M.W.; HEYSER, J.W.; DYKES, T.A.; DEMOTT, K.J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, v.157, p.385-391, 1983.

OCHATT, S.J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**, v.73A, p.581-598, 2008.

OCHATT, S.J. Flow cytometry: (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). In: **Medicago truncatula handbook**, 2006, p.1-13. Disponível em: <http://www.noble.org/medicagohandbook/>.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Passionfruit species with agronomic potential. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds) **Passionfruit: germplasm and breeding**, Embrapa Cerrados, Planaltina, 2005, p 143–158.

OSUGA, K.; MASUDA, H.; KOMAMINE, A.; GEESIN, J.C. Synchronization of somatic embryogenesis at high frequency using carrot suspension cultures: model systems and application in plant development. **Methods in Cell Science**, v.21, p.129-140, 1999.

PADMANABHAN, K.P.; CANTLIFFE, D.C.; KOCH, K.K. Auxin-regulated gene expression and embryogenic competence in callus cultures of sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Plant Cell Reports**, v.20, p.187-192, 2001.

PAIM PINTO, D.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; SILVA, M. L.; OTONI, W.C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.103, p.71-79, 2010.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VAN ONCKELEN, H.A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of

auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

PATIL, P.V.; NAVALE, P.A. Somaclonal variation in fruit crops: a review. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, v.25, p.8-14, 2000.

PHILLIPS, R.L.; T, KAEPLERT, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.91, p. 5222-5226, 1994.

PILLMOOR, J.B.; GAUNT, J.K. The behaviour and mode of action of the phenoxyacetic acids in plants. In: HUSTON, D.H., ROBERTS, T.R. (Eds.). **Progress in Pesticide Biochemistry**. Chichester , New York, NY, 1981, p.147-218.

PINHEIRO, M. V. M.; SILVA, T. C. R.; MAIA, C.; LIMA, B. V.; MOTOIKE, S. Y. Propagação in vitro de genótipos de alface via embriogênese somática. **Ciência Rural**, 2012 (*no prelo*).

PRADO, M.; RODRIGUEZ, E.; REY, L.; GONZÁLEZ, M.; SANTOS, C.; REY, M. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera*; by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.49-59, 2010.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.64, p.185- 210, 2001.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**, v.138, p.89-97, 1987.

QUE HEE, S.S.; SUTHERLAND, R.G. Physical properties of halophenoxyalkanoic acids. In: QUE HEE, S.S.; SUTHERLAND, R.G. (Eds.) **The Phenoxyalkanoic Herbicides 1**. CRC Press , Boca Raton, FL, 1981, p.1-3.

QUIROZ-FIGUEROA, F.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.; LOYOLA-VARGAS, V. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285-301, 2006.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v.81, p.93-107, 1995.

RANI, V.; RAINA, S. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.36, p.319-330, 2000.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters). 2005. 117f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Viçosa – Minas Gerais, 2005.

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

REUVENI, O.; ISRAELI, Y. Measures to reduce somaclonal variation in *in vitro* propagated bananas. **Acta Horticulturae**, v.275, p.307–313, 1990.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; DA SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.17, p.17, 2011.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.; BOLLAMMA, K. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, v.39, p.551–556, 2003.

ŠAMAJ, J.; BOBÁK, M.; BLEHOVÁ, A.; PRET'OVÁ, A. Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In: MUJIB, A.; ŠAMAJ, J. (Ed.). **Somatic Embryogenesis**. Springer Berlin / Heidelberg, 2006, p.35-50.

SANDOVAL, A.; HOCHER, V. VERDEIL, J-L. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.22, p.25-31, 2003.

SCHAUF, C.L.; BRINGLE, B.; STILLWELL, W. Membrane-directed effects of the plant hormones abscisic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.143, p.1085-1091, 1987.

SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, vol. 120, p. 358–369, 2008.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The Physiology of *in Vitro* Asexual Embryogenesis. In. **Horticultural Reviews**. John Wiley & Sons, Inc., 1980, p.268-310.

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

SILVA, M.L.; PAIM PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passionfruit (*Passiflora*

cincinnata Mast.) species based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p.47–54, 2009.

SIONG, P.; TAHA, R.; RAHIMAN, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl and leaf explants of *Brassica oleracea* var. *Botrytis* (Cauliflower). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.53, p.26-31, 2011.

SKIRVIN, R.M. Natural and induced variation in tissue culture. **Euphytica**, v.27, p.241–266, 1978.

SKIRVIN, R.M.; COYNER, M.; NORTON, M.A.; MOTOIKE, S.; GORVIN, D. Somaclonal variation: do we know what causes it? **AgBiotechNet**, v.2, 2000.

SMITH, R.S.; GRANDO, M.G.; LI, Y.L.; SEIB, J.S.; SHATTERS, R.S. Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum*). **Plant Cell Reports**, v.20, p.1017-1021, 2002.

SMÝKAL P, VALLEDOR L, RODRÍGUEZ R, GRIGA M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v.26, p.1985-1998, 2007.

SONG, X.; XIA, G.; CHEN, H. Chromosomal variation in long-term cultures of several related plants in *Triticinae*. **Acta Phytobiologica Sinica**, v.26, p.33–38; 2000.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; CARNEIRO VIEIRA, M.L.C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A Review Emphasizing Brazilian Species. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v.51, p.247-258, 2008.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.

SWIFT, H.H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.36, p.643–654, 1950.

THIEM, B.; ŚLIWIŃSKA, E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. **Plant Science**, v.164, p.129-134, 2003.

VASIL, I.K. Automation of plant propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p.105-108, 1994.

VASIL, V.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). **Annals of Botany**, v.47, p.669-678, 1981.

VEGA, R.; VÁSQUEZ, N.; ESPINOZA, A.M.; GATICA, A.M.; VALDEZ-MELARA, M. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). **Revista de Biología Tropical**, v.57, p.141-150, 2009.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp., passionfruit. In: LITZ, R.E. (Ed), **Biotechnology of fruit and nut crops**. CABI Publishing, Oxford, 2004, p.435-453.

VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Regeneration of plant protoplasts of *Passiflora* species (passion fruit). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed) **Biotechnology in agriculture and forestry**, Springer, Heidelberg, 1996, p.108–119.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002.

WANG, Q.-M.; WANG, L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Reports**, p.1-13, 2012 (on line).

WANG, X.H.; LAZZERI, P.A.; LÖRZ, H. Chromosomal variation in dividing protoplasts derived from cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.181-185, 1992.

WANG, X.U.N.; YAMADA, T.; KONG, F.-J.; ABE, Y.; HOSHINO, Y.; SATO, H.; TAKAMIZO, T.; KANAZAWA, A.; YAMADA, T. Establishment of an efficient in vitro culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anders., a potential bioenergy crop. **GCB Bioenergy**, v.3, p.322-332, 2011.

WEI, Y.D.; ZHENG, H.-G.; HALL, J.C. Role of auxinic herbicide-induced ethylene on hypocotyl elongation and root/hypocotyl radial expansion. **Pest Management Science**, v.56, p.377-387, 2000.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

WINKELMANN, T.; SANGWAN, R.S.; SCHWENKEL, H.G. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.17, p.400-404, 1998.

YANG, J.; GUI, Y.; GUO, Z. Studies on differentiation potential and chromosome stability of embryogenic callus in subcultures of *Picea meyeri* Rehd. et Wils. **Acta Botanica Boreal–Occident Sinica**, v.20, p.44-47, 2000.

YANPAISAN, W.; KING, N.J.C.; DORAN, P.M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v.17, p.3–27, 1999.

ZHANG, J.-E.; GUO, W.-W.; DENG, X.-X. Relationship between ploidy variation of citrus calli and competence for somatic embryogenesis. **Acta Genetica Sinica**, v.33, p.647-654, 2006.

ZIAUDDIN, A.; KASHA, K.J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. **Euphytica**, v.48, p.279-286, 1990.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

ZIMMERMANN, M.J. Embriogênese Somática. In: CID, L.P.B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa / Brasília, 2010, p. 67-101.