

ANA CAROLINA ATALA LOMBELO CAMPOS

ORGANOGÊNESE INDIRETA DE MARACUJAZEIRO NATIVO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Campos, Ana Carolina Atala Lombelo.
Organogênese indireta de maracujazeiro nativo / Ana Carolina Atala
Lombelo. – Lavras : UFLA, 2008.
93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Renato Paiva.
Bibliografia.

1. *Passiflora gibertii*. 2. Organogênese *in vitro*. 3. Calogênese. 4.
Anatomia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.45604165

ANA CAROLINA ATALA LOMBELO CAMPOS

ORGANOGENESE INDIRETA DE MARACUJAZEIRO NATIVO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de Julho de 2008

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Prof. Dr. Breno Regis Santos

UNIFAL

Prof. Dr. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

*A Deus,
por abençoar minha vida e estar ao meu lado,*

OFEREÇO

*Aos meus amados pais, Denise e Rubens,
A minha querida irmã, Angélica.
À vó Licedera e tia Lucy.
Ao meu querido Flávio,
pelo amor incondicional, companheirismo e incentivo,*

DEDICO

*A minha família,
Aos meus avós, tios e primos,
pela torcida*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Renato Paiva, por acreditar em mim, pelo aprendizado, amizade e incentivo durante o curso.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Breno Regis Santos, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro e Dr. Marcelo Murad Magalhães.

À Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa Cerrados – CPAC), em especial aos pesquisadores Nilton Tadeu Vilela Junqueira e Keize Pereira Junqueira, pela disponibilização de material para o desenvolvimento científico deste trabalho.

Ao professor Eduardo Alves e a Eloísa, pela disponibilidade do Laboratório de Microscopia Eletrônica e pela ajuda na condução dos experimentos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro e ao Gil e Jessé, pela disponibilidade do Laboratório de Anatomia Vegetal e pela ajuda na condução dos experimentos.

A todos os professores da UFLA e da UFSJ, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Fernanda Soares, Milene, Daiane, Fúlvia, Fernanda Carlota, Vanessa, Tina, Douglas, Diogo, Luciano, Rayris, Gabriela, Thais, Maisa, Thiago, Cleilton e Lígia, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Evaristo, D'Artagnan, Célen, Barrinha, e Odorêncio, pelo auxílio e amizade.

Ao tios Jefferson, William e Romeu, pelo carinho e apoio. A Maria José, José Marcos e Ângelo, pela torcida.

Às minhas grandes amigas Fernanda Soares, Milene, Daiane e Fernanda Carlota, por todo carinho, apoio e companheirismo.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Carolina Atala Lombelo Campos, filha de Denise Atala Lombelo Campos e Rubens de Oliveira Campos, nasceu em São João del-Rei, MG, no dia 25 de abril de 1985. cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Instituto Auxiliadora, concluindo-o em 2002. Em 2003, foi aprovada no vestibular para o curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). De 2005 a 2006, foi bolsista de Iniciação Científica da Fapemig no Laboratório de Biologia Vegetal da UFSJ. Em 2007, iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal na UFLA e, 18 meses depois, encerra esta etapa profissional com a presente dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Aspectos gerais da cultura	3
2.2 Importância das espécies nativas de maracujazeiro	4
2.3 Aspectos gerais da organogênese <i>in vitro</i>	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 2 – Organogênese indireta de maracujazeiro nativo em função de diferentes concentrações de cinetina	14
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina	21
2.1.1 Material vegetal	21
2.1.2 Calogênese	21
2.1.3 Organogênese	22
2.1.4 Aclimatização	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina	24
3.1.1 Calogênese	24
3.1.2 Organogênese	29
3.1.3 Aclimatização	33
4 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 3 - Organogênese indireta de maracujazeiro nativo em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata	40
RESUMO	40
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função de diferentes concentrações de BAP	46

2.1.1 Material vegetal	46
2.1.2 Calogênese	46
2.1.3 Organogênese	47
2.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata	47
2.2.1 Material vegetal	47
2.2.2 Calogênese	47
2.2.3 Organogênese	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de BAP	50
3.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata	53
4 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 4 – Características estruturais dos calos organogênicos de maracujazeiro nativo.....	67
RESUMO	67
ABSTRACT	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Material vegetal	72
2.2 Caracterização do explante	72
2.3 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função de diferentes concentrações de cinetina	73
2.4 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função de diferentes concentrações de BAP	74
2.5 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata	75
2.6 Microscopia eletrônica de varredura	76
2.7 Microscopia óptica	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1 Caracterização do explante	79
3.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função de diferentes concentrações de cinetina	80
3.2.1 Microscopia óptica	80
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	83
3.3 Indução de calos organogênicos em função de diferentes concentrações	

de BAP	85
3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura	85
3.4 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata	87
3.4.1 Microscopia óptica	87
4 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

RESUMO GERAL

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. **Organogênese indireta de maracujazeiro nativo**. 2008. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A ampla diversidade genética do gênero *Passiflora* consiste de potencial fonte de resistência a doenças, evidenciando o promissor uso de espécies silvestres de maracujazeiro em programas de melhoramento genético e também como porta-enxerto para variedades comerciais. *Passiflora gibertii* N. E. Brown tem acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético por apresentar resistência a doenças e pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, componentes químicos importantes, entre outras potencialidades. O objetivo do trabalho é otimizar o protocolo para a indução de calos organogênicos, o desenvolvimento dos brotos adventícios e a caracterização morfológica e anatômica da organogênese indireta de *Passiflora gibertii*. Os resultados permitem afirmar que BAP na concentração de 8,88 μM proporciona maior formação de brotos, com média de 2,5 brotos/explante, seguido pelo meio suplementado com 4,44 μM de BAP combinado com 0,054 μM de ANA (2 brotos/explante) e pelo meio suplementado com 43,2 μM de CIN (1,6 broto/explante). A ausência de CIN, contudo, favorece a formação de raízes. A calogênese é beneficiada pela adição de AgNO_3 ao meio de cultura, sendo esta maior na presença de 4,44 μM de BAP combinado com 5,4 μM de ANA, resultando em um escore médio igual a 0,91. Na presença de 2,22 μM de BAP e 32,4 μM de CIN observa-se um escore médio para a formação de calos igual a 0,72 e 0,69, respectivamente. O uso de 21,6 μM de CIN e 28,86 μM de GA_3 é efetivo para o alongamento dos brotos de origem organogênica, sendo estes enraizados com sucesso em meio $\frac{1}{2}$ MS. A aclimatização foi eficaz, resultando em taxa de sobrevivência *ex vitro* igual a 86,66%. A concentração de 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BAP foram mais efetivas para o alongamento dos brotos. A folha de *Passiflora gibertii* é hipostomática com estômatos anomocíticos. Análises de microscopia de varredura dos calos organogênicos são essenciais para se diferenciar brotos adventícios de primórdios foliares. Um padrão morfológico de desenvolvimento de brotos similar é observado através das análises estruturais dos calos organogênicos induzidos em meio de cultivo suplementado com CIN, ANA e GA_3 e com BAP e ANA na presença e ausência de AgNO_3 . Na região em que

* Comitê Orientador: Dr. Renato Paiva – UFLA (Orientador); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora).

ocorreu a formação de brotos há a predominância de células re-diferenciadas a partir do calo, com aspecto uniforme e estrutura organizada.

GENERAL ABSTRACT

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. **Indirect organogenesis of native passion fruit**. 2008. 92p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The wide genetic diversity of the gender *Passiflora* is a potential source of resistance to diseases, proving the promising use of native species of passion fruit in programs of genetic improvement and also as rootstock to commercial varieties. The native passion fruit plant *Passiflora gibertii* N. E. Brown shows important contributions to the genetic improvement due to its resistance to diseases and pests, higher longevity and adaptation to the adversal climate conditions, longer flowering period, higher concentration of secondary compounds among other potentialities. The objective of this work is to optimize the protocol to induce organogenic callus followed by the development of adventitious shoots and the morphological and anatomic characterization of indirect organogenesis in *Passiflora gibertii*. The results show that BAP in the concentration of 8.88 μM provide a higher formation of shoots with an average of 2.5 shoots/explant, followed by the medium supplemented with 4.44 μM BAP combined with 0.054 μM NAA (2 shoots/explant) and medium supplemented with 43.2 μM kinetin (1.6 shoots/explant). The absence of kinetin, however, promotes the formation of roots. The formation of callus is benefited by the addition of AgNO_3 to the culture medium, which is higher in the presence of 4.44 μM BAP combined with 5.4 μM NAA, resulting on a medium score of 0.91. In the presence of 2.22 μM BAP and 32.4 μM kinetin, an average score of callus formation of 0.72 and 0.69, respectively were observed. The use of 21.6 μM kinetin and 28.86 μM GA_3 is effective to develop the shoots obtained through indirect organogenesis, these were successfully rooted in MS medium containing half of its salt concentration. The acclimatization was efficient, resulting on an *ex vitro* survival rate of 86.66%. The concentrations of 0.054 μM NAA and 4.44 μM BAP were the most effective to promote shoots growth. The leaf of *Passiflora gibertii* is hipostomatic with anomocytic stomata. Scanning microscopy callus analyses are essential to differ adventitious shoots from leaf primordia. The same morphologic pattern of development is observed in shoots through the morphological analyses of the organogenic callus induced in medium supplemented with kinetin, NAA and GA_3 and with BAP and NAA in the presence and absence of AgNO_3 . In the area of shoot formation it is observed

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva – UFLA (Adviser); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser).

a predominance of callus re-differentiated cells, showing uniform aspect and organized structure.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescente demanda, do mercado nacional e internacional, pelo maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial dessa fruta. Entretanto, a produtividade nacional ainda é baixa, cerca de 14 t ha⁻¹ ano⁻¹, devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência do uso de cultivares superiores.

As espécies do gênero *Passiflora* são de importância econômica e seus frutos comestíveis têm propriedades medicinais e são utilizadas como ornamentais. A ampla diversidade genética verificada entre estas espécies consiste de potenciais fontes de resistência a doenças, evidenciando o promissor uso de espécies silvestres de maracujazeiro em programas de melhoramento genético e também como porta-enxerto para variedades comerciais.

As espécies *Passiflora laurifolia* L., *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* e *Passiflora gibertii* N. E. Brown são promissoras para futuros trabalhos de melhoramento. Os problemas de baixa produção podem ser solucionados por meio da criação de híbridos resistentes e tolerantes a moléstias, ou por meio da utilização de portas-enxerto resistentes para o maracujazeiro amarelo.

Contudo, apesar do grande potencial morfogenético das espécies de *Passiflora*, até o momento, não foram obtidos resultados concretos, em termos de eficiência de protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro*, para a maioria das espécies. Alguns fatores têm contribuído para isso, dentre eles, a variação da resposta entre genótipos, principalmente quando são utilizadas espécies selvagens que possuem grande variabilidade genética.

A micropropagação tem sido utilizada com frequência em inúmeras espécies vegetais por manter a identidade genética dos indivíduos e possibilitar a obtenção de um grande número de plantas saudáveis com alta qualidade fitossanitária, em um pequeno espaço físico e a curto prazo, em qualquer época do ano.

A regeneração *in vitro* pode seguir duas vias, a organogênese ou a embriogênese somática. Estas vias podem ser de forma indireta ou direta, dependendo da formação de calos. A embriogênese somática consiste no processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas em resposta a estímulos externos, dados por reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. No caso da organogênese ocorre a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles em que se formam no curso normal de desenvolvimento da planta.

Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos de microscopia eletrônica e anatomia óptica podem auxiliar na verificação e na confirmação da via de regeneração. Caracterizando-se a via de regeneração, podem-se estabelecer melhores condições de cultivo para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e obtenção de plantas. Cortes histológicos seriados, além de permitir a observação da formação de gemas adventícias ou de embriões somáticos, definindo-se a formação direta ou indireta do regenerante, permitem caracterizar as alterações celulares e a atividade de organelas durante os processos e, com isso, caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos.

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, estabelecer o protocolo para a organogênese, via indução de calos organogênicos e os posteriores desenvolvimento, enraizamento e aclimatização dos brotos adventícios obtidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura

A cultura do maracujazeiro no Brasil ocupa posição de destaque, pois, atualmente, o país é o maior produtor mundial com, aproximadamente, 448.000 toneladas por ano (ITI Tropicals, 2006). Este valor corresponde a cerca de 70% da produção mundial de maracujá, próximo a 640.000 toneladas. Apesar de ocupar esta posição, a produtividade nacional é muito variada e, na maioria das vezes, baixa em relação ao potencial produtivo da cultura. O aumento da demanda do mercado internacional e nacional do suco e da fruta *in natura* fez com que houvesse grande expansão da área plantada, entretanto, ocorreram também o surgimento e o agravamento de um grande número de doenças.

A família Passifloraceae consiste de 12 gêneros. Dentro da família, o gênero *Passiflora* é o mais rico em espécies, correspondendo a, aproximadamente, 400 espécies que se encontram amplamente distribuídas pelas regiões da América do Sul (Barbosa & Vieira, 1997).

O Brasil ocupa posição privilegiada, no que se refere aos recursos genéticos de *Passiflora*, uma vez que o maior centro de dispersão do maracujazeiro está localizado na região Central-Norte do país (Sousa & Meletti, 1997). Pesquisas com estas espécies são fundamentais para a expansão do cultivo comercial e a identificação de materiais resistentes às doenças que afetam as principais espécies de interesse econômico de *Passiflora* (Lombardi et al., 2007).

Barbosa & Vieira (1997) relatam a existência de mais de 200 espécies de *Passiflora* nativas do Brasil, com a conseqüente presença de uma grande variabilidade genética que pode ser explorada em programas de melhoramento genético. Esta variabilidade dentro do gênero pode ser utilizada por melhoristas em seus esforços para aperfeiçoar os aspectos relacionados ao florescimento, à

resistência a doenças, à tolerância ao frio e, principalmente, às características do fruto.

O estudo da diversidade genética de potenciais genitores é uma etapa básica e de fundamental importância para o sucesso de programas de melhoramento genético, visando à obtenção de variedades com maior qualidade produtiva, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies selvagens (Barbosa & Vieira, 1997).

2.2 Importância das espécies nativas de maracujazeiro

A cultura do maracujazeiro tem significativa participação no mercado nacional. A evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial. Entretanto, a produtividade nacional ainda é baixa, devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência do uso de cultivares superiores (IBGE, 2006).

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de maracujá, o nível tecnológico da cultura ainda é baixo. Entre as diversas causas, está o sistema adotado para a propagação da planta via sementes. Esse sistema de produção de mudas resulta na elevada variabilidade dos pomares; os problemas são ampliados com a auto-incompatibilidade presente no maracujá. Assim, a propagação vegetativa é um recurso que possibilita a perpetuação dos clones mais produtivos uniformemente (Meletti & Nagai, 1992).

Outro fator que caracteriza o baixo nível tecnológico do maracujazeiro-amarelo no Brasil é a baixa produtividade, a qual se deve, em grande parte, aos problemas fitossanitários, dos quais as doenças provocadas por patógenos de solo estão entre as economicamente mais impactantes (Meletti & Bruckner, 2001). A enxertia apresenta vantagens, tais como a conservação das características da planta-mãe e o controle de doenças (Ruggiero, 1991). Várias

espécies silvestres de *Passiflora* têm apresentado resistência a patógenos de solo (Junqueira et al., 2002) e sua utilização como porta-enxerto seria uma alternativa no controle de nematóides (Paula, 2006).

Entre as diversas espécies de passifloras silvestres do Brasil, algumas têm características importantes que podem ser introduzidas no maracujazeiro comercial. Vários autores (Menezes et al., 1994; Oliveira et al., 1994; Meletti & Bruckner, 2001; Fischer, 2003) relatam a resistência de *Passiflora nitida*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora laurifolia*, alguns acessos de *Passiflora suberosa*, *Passiflora alata*, *Passiflora coccinea*, *Passiflora gibertii* e *Passiflora setacea* a diversas doenças causadas por patógenos do solo. Segundo Junqueira et al. (2005), além da resistência a doenças e pragas, há algumas espécies autocompatíveis e outras que apresentam características morfológicas e aspectos fenológicos relacionados ao florescimento bastante específicos. Estes autores relatam ainda a possibilidade de se obterem híbridos férteis e promissores para o melhoramento, utilizando-se espécies de passifloras como progenitores.

Dentre as espécies nativas silvestres de *Passiflora* spp., o *Passiflora gibertii* N. E. Brown tem acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentar, além da resistência a doenças e pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos de interesses para a indústria farmacêutica, entre outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas (Figueiredo et al., 2007).

Paula (2006) descreve a espécie *Passiflora gibertii* N. E. Brown como sendo promissora para o uso como porta-enxerto, uma vez que esta é resistente a diversas moléstias, como a morte precoce, a cladosporiose e a bacteriose (Souza & Meletti, 1997; Oliveira & Ruggiero, 1998). Ela é mencionada também por Junqueira et al. (2005) como uma espécie altamente resistente à bacteriose nas folhas e à antracnose nos frutos e nos ramos.

Menezes et al. (1994) e Oliveira et al. (1994) relatam a boa compatibilidade da espécie *Passiflora gibertii* como porta-enxerto para o maracujazeiro- amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Oliveira et al. (1994) afirmam ainda que a utilização de *P. gibertii* como porta-enxerto para *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg apresenta-se como uma medida promissora para o controle da morte prematura das plantas.

No Brasil, ainda são escassas as informações sobre o comportamento de maracujazeiros comerciais enxertados em espécies de passifloras silvestres. As dificuldades encontradas, segundo Meletti & Bruckner (2001), devem-se ao fato de os portas-enxerto oriundos de sementes da maioria das espécies silvestres apresentarem o inconveniente de gerar plantas com caules muito finos e, portanto, incompatíveis com o diâmetro dos garfos que são obtidos de plantas adultas. Outro problema consiste na baixa taxa de germinação das sementes e ou no desenvolvimento lento de algumas espécies silvestres (Menezes et al., 1994; Meletti & Bruckner, 2001). Estes problemas dificultam o processo de enxertia e aumentam o custo de produção e o tempo requerido para a formação da muda (Siqueira & Pereira, 2001).

2.3 Aspectos gerais da organogênese *in vitro*

A organogênese *in vitro* pode ser definida como o processo no qual células e tecidos vegetais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está freqüentemente conectado com o tecido de origem. Pode ocorrer diretamente, a partir de células do explante original ou, indiretamente, via formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*. Alguns autores relatam o cultivo *in vitro* de espécies de maracujá, utilizando como explantes segmentos nodais e internodais (Kantharajah & Dodd,

1990; Drew, 1991; Faria & Segura, 1997), gemas apicais (Scorza & Janick, 1980; Drew, 1991; Faria & Segura, 1997; Junghans et al., 2002), protoplastos (Dornelas, 1995; Otoni et al., 1996); primórdios de brotos (Kawata et al., 1995) e discos foliares (Monteiro-Hara, 2000).

A grande maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Passiflora* foi realizada com *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, enfatizando a indução e a multiplicação de gemas por meio de segmentos nodais, internodais e discos foliares (Monteiro-Hara, 2000). Segundo Takahashi (2002), a organogênese tem sido relatada para as espécies *P. amethystina*, *P. gibertii*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. molissima*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. suberosa*.

A organogênese *in vitro* é o principal meio de regeneração em *Passiflora* e pode ser por via direta (Dornelas & Vieira, 1994; Appezzato-da-Glória et al., 1999; Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004) ou indireta (Monteiro et al., 2000; Lombardi et al., 2007), dependendo da fonte do explante e do genótipo utilizado. Protocolos para a indução da organogênese em explantes de *Passiflora* são bem conhecidos e o uso de BAP ou, menos freqüentemente, TDZ, é recomendado (Fernando et al., 2007).

A regeneração de estruturas foliares na superfície de explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa* é muito freqüente (Appezzato-da-Glória et al., 2005), contudo, tem sido erroneamente interpretada na literatura como brotos que não alongaram. Também brotos de origem quimeral, por exemplo, com células transformadas e não-transformadas, têm sido recuperados, mas estes não são úteis para a transformação (Fernando et al., 2007).

A organogênese na cultura de tecidos tem fornecido sistemas úteis para o estudo do desenvolvimento de plantas superiores (Ozawa et al., 1998). Observações feitas por Scoog & Miller (1957) evidenciam que a organogênese de brotos é regulada pelo balanço entre auxina e citocinina no meio de cultura. A

indução de brotos, a diferenciação e o desenvolvimento têm sido intensivamente estudados utilizando diversas espécies anuais por meio de abordagens genética, molecular, bioquímica e celular (Lombardi et al., 2007).

A organogênese *in vitro* consiste de muitos aspectos, tais como a percepção de fitohormônios, desdiferenciação de células para adquirir competência organogênica, reentrada de células quiescentes no ciclo celular e organização da divisão celular para formar meristemas e primórdios de órgãos específicos. Alguns dos processos elementares e genes essenciais envolvidos neste processo estão sendo identificados por meio de análises genéticas com a utilização de mutantes (Sugiyama, 1999).

Em geral, são reconhecidas três fases da organogênese, com base no requerimento temporal de um balanço específico de fitohormônios no controle da organogênese. Na primeira fase, as células dos explantes adquirem competência, a qual é definida como a habilidade de responder a sinais hormonais de indução de órgãos. O processo de aquisição da competência organogênica é referido como ‘desdiferenciação’, em que a competência das células dos explantes cultivados é canalizada e determinada para a formação de um órgão específico sob a influência do balanço de fitohormônios durante a segunda fase. Então, a morfogênese ocorre independentemente das fontes exógenas de fitohormônios durante a terceira fase (Sugiyama, 1999).

O processo organogênico depende da aplicação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e também da habilidade do tecido em responder ao estímulo durante a cultura. Desse modo, a natureza manipulável da cultura de tecidos pode ser explorada para o melhor entendimento do processo fisiológico que resulta na organogênese *in vitro* (Christianson & Warnik, 1985; Lo et al., 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A.; MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 387-407.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, nov. 1999.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behaviour of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* Degener + *P. amethystine* Mikan. **Euphytica**, Dordrecht, v. 98, n.1/2, p. 121-127, July 1997.
- BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GONGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 87-90, Oct. 2004.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, San Diego, v. 112, n. 2, p. 494-497, 1985.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 23-27, July 1991.
- DORNELAS, M. C. **Cultura e fusão de protoplastos de Passiflora ssp.** 1995. 182 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 211-217, Feb. 1994.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, Dec. 1997.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 37-44, Oct. 2007.

FIGUEIREDO, M. A. de; PAIVA, R. SOUZA, A. C. de; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FISCHER, I. H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasitica***. 2003. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGINS, C. M.; DIETZGEN, R. G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* × *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, n. 5, p. 673-680, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 15 maio. 2008.

ITI Tropiclas. Disponível em: <<http://www.passionfruitjuice.com>>. Acesso em 15 maio 2008.

JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura In. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRITICULTURA, 17., 2002, Belém. **Os novos desafios da fruticultura brasileira**. Belém, 2002. 1 CD-ROM.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, R. C.; MANICA, I; PEIXOTO, J. R.; PEREIRA, A. V.; FIALHO, J. F. **Propagação do maracujazeiro-azedo por enxertia em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas**. 15 p. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 39).

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 337-339, mar. 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, n. 2, p. 281-284, Nov. 1995.

LO, K. H.; GILES, K. L.; SAWHANEY, V. K. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confuse* hybrids (African violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 6, p. 416-420, Mar. 1997.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. da S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 239-247, Mar. 2007.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI, L. M. M.; NAGAI, V. Enraizamento de estacas de sete espécies de maracujazeiro (*Passiflora* ssp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p. 163-168, 1992.

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D. A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 95-104, 1994.

MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 571-573, jul./set. 2000.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; CENTURION, M. A. P. C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R.; MAURO, A. O.; SACRAMENTO, C. K. Avaliação de Passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador: SBF, 1994. v. 3, p. 827.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro-amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 291-310.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 43, n. 246, p. 157-164, mar./abr. 1996.

OZAWA, S.; YASUTANI, I.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A.; SUGYAMA, M. Organogenic responses in tissue culture of *srd* mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 135-142, Jan. 1998.

PAULA, M da S. **Diversidade genética e reação de *Passiflora* ssp. a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica***. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

RUGGIERO, C. Enxertia do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do maracujazeiro no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 43-59.

SCOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of Social and Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 105, n. 6, p. 892-897, Nov./Dec. 1980.

SIQUEIRA, D. L. de; PEREIRA, W.E. Propagação. In: BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. **Maracujá**: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 85-137.
SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá**: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 1, p. 61-64, Apr. 1999.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CAPÍTULO 2

ORGANOGÊNESE INDIRETA DE MARACUJAZEIRO NATIVO, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CINETINA

RESUMO

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Organogênese indireta de maracujazeiro nativo, em função de diferentes concentrações de cinetina. In: _____. **Organogênese indireta de maracujazeiro nativo**. 2008. Cap.2, p. 14-39. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

A tecnologia da cultura de tecidos e de células vegetais tem sido aplicada nos campos da morfologia, da bioquímica, da fisiologia, da genética celular e da biologia molecular, assim como para a propagação e melhoramento de aspectos de espécies de plantas economicamente importantes. A organogênese é uma via de regeneração utilizada em estudos de cultura de tecidos. É o processo pelo qual células e tecidos são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de órgãos adventícios *in vitro*, a qual pode ocorrer direta ou indiretamente, por meio da formação de calo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o protocolo para a indução de calos organogênicos, o desenvolvimento, enraizamento e aclimatização dos brotos adventícios, em função de diferentes concentrações de cinetina. Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas *in vitro* de maracujazeiro nativo. Para a indução de calos segmentos foliares de $\approx 1 \text{ cm}^2$ receberam pequenos cortes em sua superfície abaxial e foram inoculados em meio $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com água de coco (5%), sacarose (3%) e diferentes concentrações de cinetina (0; 10,8; 21,6; 32,4 e 43,2 μM). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 90 dias. O número de brotos e a formação de calos foram avaliados. Para o alongamento dos brotos, os calos organogênicos obtidos foram transferidos para $\frac{1}{2}$ MS suplementado com água de coco (5%), sacarose (3%) e CIN combinada com ANA e GA_3 . Estes foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. Após este período, os calos foram mantidos em $\frac{1}{2}$ MS suplementado com água de coco (5%), sacarose (3%), 21,6 μM CIN e 28,86 μM GA_3 , durante 120 dias. As brotações obtidas via organogênese indireta foram inoculadas em $\frac{1}{2}$ MS

* Comitê Orientador: Dr. Renato Paiva -UFLA (Orientador); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora).

suplementado com sacarose (3%), para o enraizamento e mantidas em sala de crescimento, por 30 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para tubetes contendo Plantmax® irrigado com solução nutritiva MS contendo ¼ da concentração de seus sais, cobertos com sacos plásticos, os quais foram abertos gradativamente. Estes foram mantidos em sala de crescimento, a $25\pm 2^\circ$ C de temperatura, irradiância de fótons de $43\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. A presença ou ausência de raiz, o tamanho da parte aérea e o número de folhas foram avaliados, 30 dias após a transferência das plântulas para o meio de enraizamento e 30 dias após o início da aclimatização. Os resultados obtidos permitem afirmar que a concentração de $43,2 \mu\text{M}$ de CIN no meio de indução é efetiva para a formação de brotos adventícios, contudo, a sua ausência favorece a formação de raízes. Ocorre maior formação de calos em meio de cultivo suplementado com $32,4 \mu\text{M}$ de CIN. O meio suplementado com $21,6 \mu\text{M}$ de CIN e $28,86 \mu\text{M}$ de GA_3 é efetivo para o alongamento dos brotos de origem organogênica na espécie de maracujazeiro nativo. ½ MS promove o enraizamento dos brotos adventícios. A aclimatização de *Passiflora gibertii* foi eficaz, resultando em elevada taxa de sobrevivência *ex vitro*, igual a 86,66%.

ABSTRACT

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Indirect organogenesis of native passion fruit plant using different concentrations of kinetin. In: _____. **Indirect organogenesis of native passion fruit**. 2008. Chap.2, p. 14-39. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, MG.
*

The technology of the plant tissue culture has been used in the areas of the morphology, biochemistry, physiology, cellular genetics and molecular biology, as well as for the propagation and improvement of economically important plant species. The organogenesis is a regeneration path used in studies related to tissue culture. It is the process which induces cells and tissues to suffer changes leading to the production of *in vitro* adventitious organs, which may occur direct or indirectly, through the formation of callus. The objective of this work was to optimize the protocol of organogenic callus induction, its development, rooting and acclimatization of adventitious shoots using different concentrations of kinetin. Leaf explants were obtained from *in vitro* seedlings of native passion fruit. For callus induction, leaf segments of $\approx 1 \text{ cm}^2$ received small cuts in its abaxial surface and were inoculated in the $\frac{1}{2}$ MS medium, supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%) and different concentrations of kinetin (0, 10.8, 21.6, 32.4 and 43.2 μM). After inoculation, the explantes were maintained in growth room in the dark with temperature of $25\pm 2^\circ \text{C}$, for 90 days. The number of shoots and the formation of callus were evaluated. For shoot development, organogenic callus obtained were transferred to $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%) and kinetin combined with NAA and GA_3 . These explants were maintained in growth room, under photons irradiance of $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of $25\pm 2^\circ \text{C}$ and photoperiod of 16 hours, for 60 days. After this period, the callus were maintained in $\frac{1}{2}$ MS supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%), 21.6 μM kinetin and 28.86 μM GA_3 , for 120 days. The shoots obtained through indirect organogenesis were inoculated in $\frac{1}{2}$ MS supplemented with sucrose (3%) for rooting and maintained in growth room for 30 days. After this period, the plants were transferred to tubes containing Plantmax® irrigated with MS nutritive solution containing $\frac{1}{4}$ of its salt concentration and covered with plastic bags which were open gradually. These plants were maintained in growth room, under photons irradiance of $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of $25\pm 2^\circ \text{C}$ and photoperiod of 16 hours. The presence of roots, shoot length and the number of

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - UFLA (Adviser); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser).

leaves were evaluated, 30 days after plant transference to rooting medium and 30 days after the beginning of the acclimatization. The results show that the concentration of 43.2 μM kinetin in the induction medium is effective for the formation of adventitious shoots, however on its absence favors, root formation is promoted. Higher formation of callus is observed in medium supplemented with 32.4 μM kinetin. The use of 21.6 μM kinetin and 28.86 μM GA_3 is effective for the development of the organogenic shoots. $\frac{1}{2}$ MS promotes rooting of adventitious shoots. The acclimatization of *Passiflora gibertii* was efficient, resulting in a high *ex vitro* survival rate of 86.66%.

1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies não cultivadas de maracujazeiro, como *Passiflora gibertii* N. E. Brown, têm acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentarem resistência a doenças e pragas, maior longevidade, adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica, entre outras potencialidades ainda inexploradas (Figueiredo et al., 2007).

A propagação do maracujá é feita, predominantemente, por meio da reprodução sexuada (Meletti & Maia, 1999). Está é uma consequência das características florais e da auto-incompatibilidade, resultando em plantas com alta variabilidade genética e não uniformidade. Nesse contexto, a cultura de tecidos de plantas se apresenta como importante ferramenta para propagar genótipos superiores (Reis et al., 2003).

A tecnologia da cultura de tecidos e células vegetais tem sido aplicada nos campos da morfologia, bioquímica, fisiologia, genética celular e biologia molecular, assim como para a propagação de plantas e o melhoramento de aspectos de espécies economicamente importantes. Em algumas espécies, a formação de brotos adventícios e o sistema de regeneração de plantas são vantajosos, uma vez que estes acarretam em menor variação somaclonal em relação a outros métodos de cultura de tecidos como a embriogênese somática (Guo et al., 2004).

A organogênese é uma via de regeneração utilizada em estudos de cultura de tecidos. É o processo pelo qual células são induzidas a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio caulinar (caulogênese) ou de raiz (rizogênese), cujo sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido parental (Thorpe, 1994). Levando

assim à produção de órgãos adventícios *in vitro*, a organogênese pode ocorrer direta (sem formação de calo) ou indiretamente, por meio da formação de calo. O calo é uma massa compacta de células desorganizadas, em diferentes estágios de dediferenciação (Lombardi et al., 2007).

De acordo com Christianson & Warnick (1988), a organogênese *in vitro* pode ser dividida em etapas: dediferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão. A competência é entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário para a indução da formação do órgão. Outro fator ligado à competência organogênica é o próprio metabolismo hormonal do explante, pois ele determina o balanço hormonal endógeno para a indução da organogênese (Peres & Kerbauy, 1999).

Rizogênese e caulogênese ocorrem em células e em tecidos de plantas, em resposta à manipulação dos níveis exógenos hormonais (Mercier et al., 2003). Para espécies de *Passiflora*, a regeneração de plantas pela organogênese e a micropropagação *in vitro* vêm sendo obtidas por vários autores. A maioria dos reguladores vegetais utilizados é do grupo das citocininas, principalmente benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e zeatina, podendo ser acrescidas pequenas concentrações de auxinas, como ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA) ou 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Monteiro et al., 2000).

Tem se verificado também que o uso de água de coco na cultura de tecidos aumenta a porcentagem de explantes com brotos (Dornelas & Vieira, 1994; Hall et al., 2000) e o tamanho destes (Hall et al., 2000), resultando em brotos com maior qualidade e aparência. Outros fatores também podem influenciar, de forma direta ou indireta, o sucesso da morfogênese *in vitro*, como, por exemplo, as características da planta-mãe, o tipo de explante, o

balanço de fitorreguladores, a disponibilidade de nutrientes, as condições ambientais nas quais se dá o cultivo e os fatores genéticos, entre outros.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o protocolo para a indução de calos organogênicos de *Passiflora gibertii* N. E. Brown, bem como o posterior desenvolvimento, enraizamento e aclimatização dos brotos adventícios, em função de diferentes concentrações de cinetina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina

2.1.1 Material vegetal

Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown – acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF.

2.1.2 Calogênese

A região central das folhas foi excisada em segmentos de ≈ 1 cm². Em seguida, efetuaram-se pequenos cortes em sua superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e este solidificado com ágar (0,6%), antes da autoclavagem, a 120° C, durante 20 minutos.

Para a indução de calos organogênicos, os explantes foliares foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de cinetina (0; 10,8; 21,6; 32,4 e 43,2 μ M). Após a inoculação de um explante foliar em cada tubo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C, durante 90 dias.

Avaliaram-se o número de brotos obtidos e a formação de calos nos explantes foliares. A presença de calos foi avaliada por meio de observações visuais, de acordo com as seguintes categorias: 0 = ausência de calos; 1 = explante entumescido; 2 = início da calogênese; 3 = 50% do explante coberto por calos e 4 = explante totalmente coberto por calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante

foliar. Para a variável formação de calos, os resultados foram analisados no programa estatístico SAS®, pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o escore médio de formação de calos. Ao se avaliar o efeito de diferentes concentrações de cinetina na formação de brotos, a significância das diferenças entre as médias foi avaliada pelo teste de regressão, a 5%, utilizando o software estatístico Sisvar®.

2.1.3 Organogênese

Para o alongamento dos brotos, os calos organogênicos obtidos anteriormente foram transferidos para meio MS contendo metade da concentração de seus sais acrescido de água de coco (5%), sacarose (3%) e suplementado com CIN combinada com ANA e GA₃, resultando nas seguintes combinações: 0; 21,6 µM CIN; 21,6 µM CIN + 0,54 µM ANA; 21,6 µM CIN + 28,86 µM GA₃ e 21,6 µM CIN + 0,54 µM ANA + 28,86 µM GA₃. O tratamento de origem dos calos foi marcado. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 e este solidificado com ágar (0,6%), antes da autoclavagem, a 120° C, durante 20 minutos. Após inoculação, os calos organogênicos foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2° C e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. Avaliou-se, então, o número de brotos obtidos via organogênese indireta.

Após este período os calos foram mantidos em meio de cultura suplementado com 21,6 µM CIN e 28,86 µM GA₃, pelo período de 120 dias, durante o qual estes foram repicados por quatro vezes. Avaliaram-se, então, o número de brotos alongados e o tamanho médio destes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 8 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante foliar. Para a variável formação de calos, os resultados foram analisados no

programa estatístico SAS®, pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o escore médio de formação de calos.

Ao se avaliar o efeito de diferentes combinações de CIN, ANA e GA₃ na formação e no alongamento dos brotos e o tamanho médio destes, após transferidos para meio com CIN e GA₃, os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software estatístico Sisvar®. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, com significância fixada em 5%.

2.1.4 Aclimatização

As brotações obtidas via organogênese indireta foram inoculadas em meio MS, contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com sacarose (3%) para enraizamento. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 e o meio solidificado com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120° C, durante 20 minutos. Após inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25±2° C e fotoperíodo de 16 horas, por 30 dias.

Em seguida, as plantas foram transferidas para tubetes com substrato Plantmax® irrigado com solução nutritiva MS, contendo ¼ da concentração de seus sais, cobertos com sacos plásticos, os quais foram abertos gradativamente. Estes tubetes foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25±2° C e fotoperíodo de 16 horas.

Avaliaram-se a presença ou a ausência de raiz, o tamanho da parte aérea e o número de folhas, no início da aclimatização e 30 dias depois. Para a análise estatística, a significância das diferenças entre as médias das variáveis analisadas foram avaliadas pelo teste de médias Scott Knott, com o nível de significância fixado em 5%, utilizando-se o software estatístico Sisvar®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina

3.1.1 Calogênese

Após 90 dias de cultivo em meio de indução, os explantes foliares mantidos no escuro exibiram organogênese indireta, com a formação de múltiplos brotos e raízes ao longo da superfície dos calos formados. Os resultados obtidos em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de cinetina se encontram nas Figuras 1 e 2.

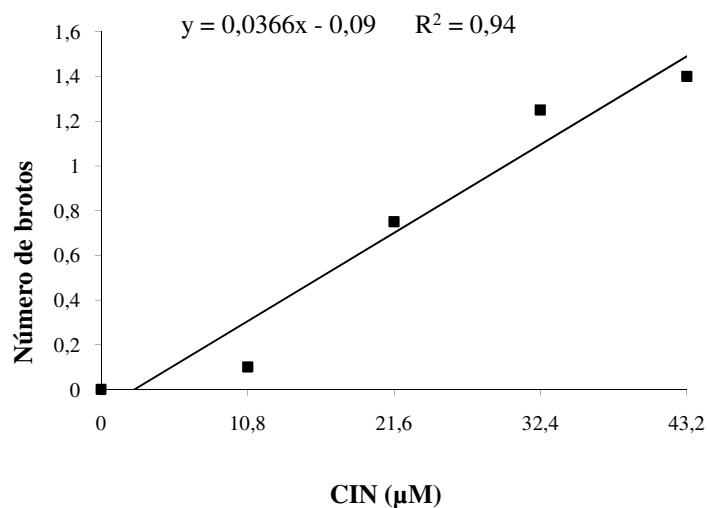


FIGURA 1. Número de brotos obtidos via organogênese indireta, a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, em função de diferentes concentrações de CIN.

A formação de brotos via organogênese indireta não ocorreu na ausência do regulador de crescimento cinetina, o qual foi efetivo no desenvolvimento de

brotos adventícios. O número de brotos foi maior em explantes mantidos em meio suplementado com 43,2 μM de CIN, com média de 1,4 broto por explante.

Monteiro et al. (2000) observaram a organogênese em discos foliares de *Passiflora suberosa* em meio MS suplementado com 2,22 ou 4,44 μM de BAP, depois de 4 a 8 semanas de cultivo. Após indução, os calos foram transferidos para meio contendo 2,88 μM de GA_3 , no qual ocorreram o desenvolvimento, o alongamento e o enraizamento dos brotos obtidos via organogênese indireta.

A formação de brotos adventícios nos discos foliares de *Passiflora cincinnata* também foi relatada, por Lombardi et al. (2007), em meio de cultura contendo o regulador BAP. Este fato também foi observado nos segmentos internodais de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, por Biasi et al. (2000) e em discos foliares de *Passiflora suberosa*, por Monteiro et al. (2000).

Becerra et al. (2004), ao descreverem um protocolo para a regeneração de brotos *in vitro* a partir de discos foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, observaram maior produção de novo de brotos em explantes de plantas com dois meses de idade, cultivados em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP e 2,32 μM de CIN.

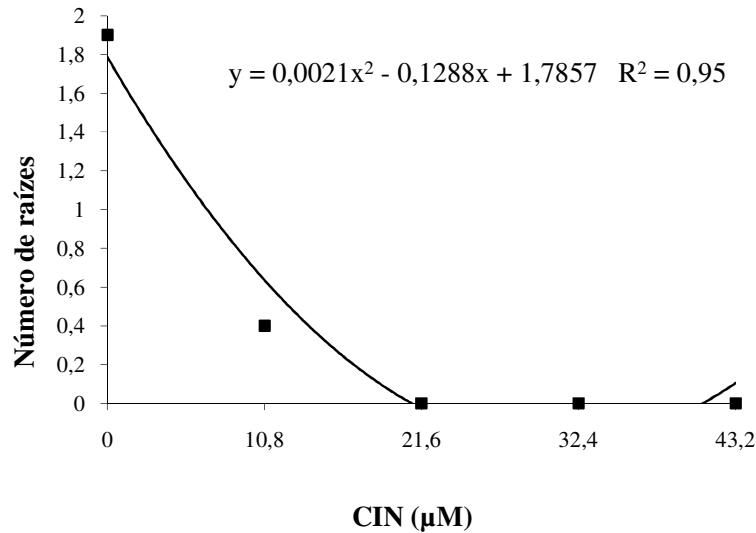


FIGURA 2. Número de raízes obtidas via organogênese indireta, a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, em função de diferentes concentrações de CIN.

A formação de raízes via organogênese indireta ocorreu, com maior frequência, na ausência do regulador de crescimento cinetina e, com o aumento da concentração deste regulador, observou-se diminuição da formação de raízes via organogênese indireta em explantes foliares de *Passiflora gibertii*. Isso pode ter ocorrido devido ao balanço auxina/citocinina nos explantes foliares desta espécie.

Apezatto-da-Glória et al. (1999) estudaram a organogênese *in vitro* em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., o maracujá-amarelo, cultivando explantes foliares em meio contendo ANA ou BAP, no escuro e na presença de luz. Estes autores observaram que o escuro induz a rizogênese, na presença de ANA, enquanto a regeneração de brotos é estimulada pela luz e BAP.

A formação de raízes adventícias a partir de explantes foliares foi previamente descrita para diversas espécies em resposta a auxinas (Apezatto-da-Glória et al, 1999; Koroch et al., 2002; Wadegaonkar et al., 2006; Lima et al.,

2008). A interação entre as auxinas endógenas e exógenas pode estimular a atividade de divisão celular e o subsequente desenvolvimento de meristemas radiculares, similarmente à formação de raízes laterais (Taiz & Zeiger, 2004).

Lima et al. (2000) apontam que a diferenciação da parte aérea e radicular é controlada pelo balanço entre citocinina e auxina. O maior teor de citocinina é favorável à proliferação de gemas, enquanto o de auxina induz a formação de raízes. No maracujazeiro, a adição apenas de citocinina ao meio de cultura MS promove a resposta esperada de regeneração de gemas, provavelmente pelo fato de a quantidade endógena de auxina já ser suficiente para estabelecer o equilíbrio necessário à diferenciação (Moran Robles, 1978).

Verificou-se que houve diferença estatística quanto ao escore médio de formação de calos, quando foram empregadas diferentes concentrações de cinetina. A maior formação de calos foi observada na concentração de 32,4 μM de CIN e a menor, na ausência deste regulador, evidenciando que a utilização de cinetina é necessária para a formação de calos (Figura 3). Os tratamentos em que ocorreu a maior formação de calos também foram aqueles em que houve maior número de brotos adventícios.

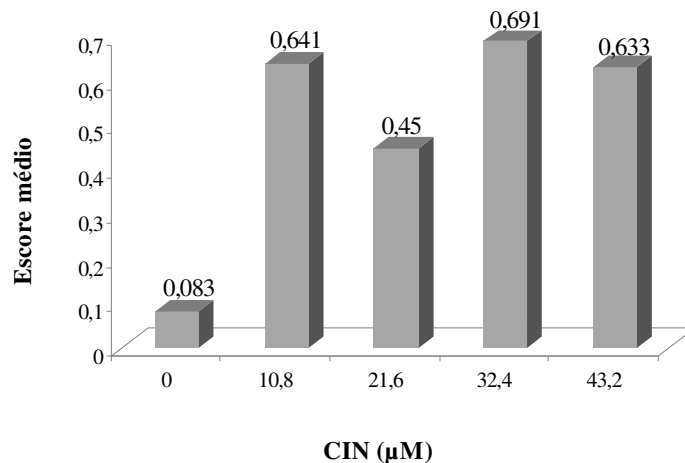


FIGURA 3. Formação de calos a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, em função de diferentes concentrações de CIN.

Biasi et al. (2000), ao estudarem a indução de organogênese em segmentos internodais do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), cultivados em meio contendo de 4,44 µM a 17,76 µM de BAP, observaram a proliferação de calos nas extremidades dos explantes em todos os tratamentos, inclusive no controle. A proliferação de brotos ocorreu associada com a formação de calos em um padrão contínuo.

Em *Passiflora cincinnata* Mast, a formação de gemas nos discos foliares foi observada após a formação de calo nas extremidades do explante. A organogênese indireta nesta espécie somente ocorreu em meio de cultura contendo BAP (Lombardi, 2003). Monteiro et al. (2000), ao avaliarem explantes foliares de *Passiflora suberosa* mantidos durante quatro semanas em meio de indução, no escuro, não verificaram a formação de calos em nenhum dos explantes do tratamento testemunha. Já nos tratamentos contendo BAP, observou-se a formação de calos em 100% dos explantes. Esta formação ocorreu na borda dos discos foliares cultivados em meio contendo 2,22 ou 4,44 µM de BAP.

Figueiredo et al. (2007), ao estudarem a formação de calos em *Passiflora edulis edulis* e *Passiflora gibertii* a partir de segmentos foliares na presença de BAP, observaram que a espécie *Passiflora gibertii* apresentou maior formação de calos (41,4%) em relação a *Passiflora edulis edulis*, com média de 0,66% de formação de calos.

3.1.2 Organogênese

Ao se transferir os calos obtidos com o uso de diferentes concentrações de cinetina para meio MS suplementado com diferentes combinações de CIN, ANA e GA₃, observou-se que não houve diferença estatística entre as origens marcadas de cada tratamento. Entretanto, houve diferença estatística entre os tratamentos empregados (Tabela 1).

TABELA 1. Número médio de brotos observados em calos formados a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Número médio de brotos *
0	0,00 b
21,6 µM CIN	0,35 a
21,6 µM CIN + 0,54µM ANA	0,55 a
21,6 µM CIN + 28,86µM GA ₃	0,57 a
21,6 µM CIN + 0,54µM ANA + 28,86µM GA ₃	0,60 a

* Letras iguais não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, a 5% de significância.

Aos 60 dias de cultivo, um maior número de brotos foi observado em meio suplementado com 21,6 µM CIN, 0,54 µM ANA e 28,86 µM GA₃, no entanto este não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, exceto do grupo controle, no qual não se empregou nenhum regulador de crescimento e também não se observou a formação de brotos adventícios.

A citocinina BAP pode induzir a formação de brotos adventícios via organogênese indireta na espécie *Punica granatum*, mas em uma frequência baixa. Um suplemento com ANA foi benéfico e a combinação de 8,9 μM de BAP com 5,4 μM de ANA provou ser o melhor meio para a organogênese de brotos. A combinação de ANA e BAP também foi benéfica para muitas espécies de árvores frutíferas (Zimmerman & Swartz, 1994).

Em explantes de sementes de *Arachis stenosperma* Krapov., a organogênese indireta foi observada em resposta ao uso de BAP ou deste em associação com ANA (Pacheco et al., 2008).

A interação entre as concentrações de cinetina e os tratamentos empregados no experimento de alongamento dos brotos foi significativa somente para os explantes oriundos do meio suplementado com 10,8 μM de CIN (Figura 4). Evidenciando que houve maior formação de brotos nos calos oriundos do meio de indução com 10,8 μM de CIN transferidos para meio contendo 21,6 μM CIN, 0,54 μM ANA e 28,86 μM GA₃.

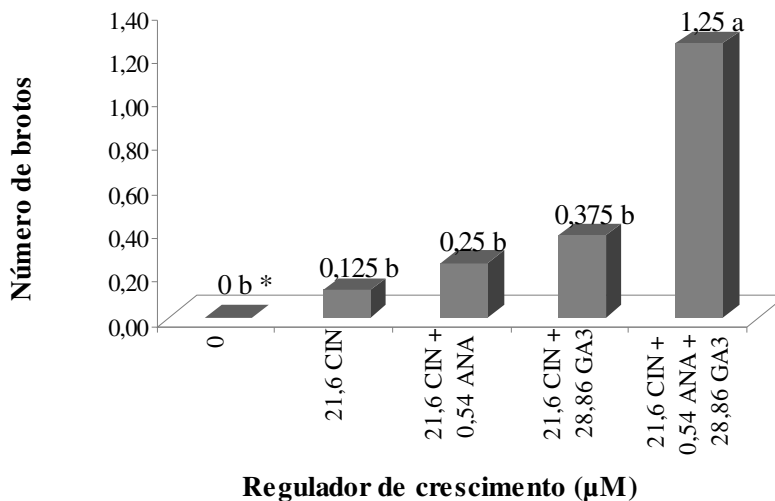


FIGURA 4. Número médio de brotos presentes nos calos organogênicos de *Passiflora gibertii*, induzidos em meio suplementado com 10,8 µM de CIN e transferidos para os tratamentos empregados no experimento de alongamento dos brotos. *Letras iguais não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, a 5% de significância.

Segundo Arigita et al. (2005), as citocininas regulam muitos processos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos nas plantas. Contudo, em altas concentrações e longos períodos de incubação dos explantes, sua presença pode inibir o alongamento dos brotos, a expansão foliar e também aumentar a hiper-hidricidade.

Biasi et al. (2000) estudaram a organogênese em segmentos internodais de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivados em meio contendo BAP. Estes autores verificaram maior número de brotos com folhas expandidas em explantes iniciados em meio contendo 4,44 µM de BAP, ocorrendo diminuição quando concentrações mais altas deste regulador foram utilizadas para a indução.

Dornelas & Vieira (1994) também observaram o efeito desvantajoso de 8,88 μM de BAP no meio de indução e após, no meio de alongamento dos brotos em diferentes espécies de *Passiflora*. Isso, provavelmente, ocorre devido a um efeito residual do regulador. Depois de mantidos no meio suplementado com 21,6 μM CIN e 28,86 μM GA₃ por 120 dias, 31% dos explantes apresentavam brotos alongados e com tamanho médio de 3,89 cm (Figura 5).

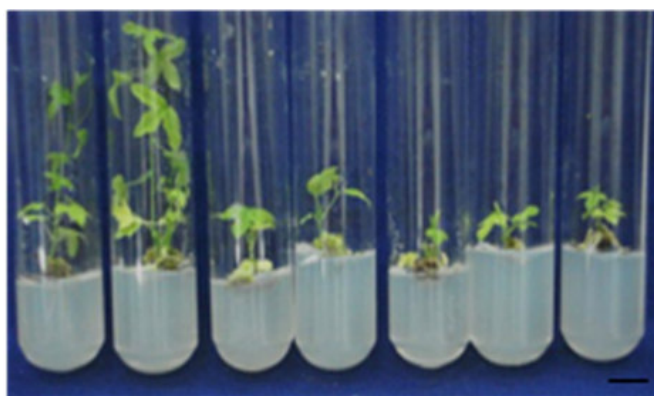


FIGURA 5. Brotos alongados mantidos em meio com 21,6 μM CIN + 28,86 μM GA₃, durante 120 dias. Barra = 1 cm.

Isutsa (2004) observou que a combinação de 22,2 μM de BAP com 11,6 μM de GA₃ no meio, para iniciar e fazer proliferar brotos adventícios de maracujazeiro roxo, depois de 4 semanas, provocou o alongamento dos brotos, que puderam ser facilmente subcultivados e enraizados. Durante a micropropagação, Amugune et al. (1993) também verificaram que o GA₃ estimula o alongamento de brotos do maracujazeiro-roxo.

A regeneração de brotos adventícios da espécie *Acacia sinuata* a partir de calos foi obtida em meio suplementado com 10% de água de coco, 13,2 μM de BAP e 3,42 μM de AIA. A adição de 1,73 μM de GA₃ favoreceu o alongamento dos brotos (Vengadesan et al., 2000).

3.1.3 Aclimatização

Aos 30 dias após o início da aclimatização havia um maior número de plantas enraizadas, diferindo estatisticamente do primeiro dia de aclimatização. O mesmo foi observado com relação ao tamanho da parte aérea, com média de 3,88 cm no primeiro dia e de 14,7 cm, 30 dias depois. Já com relação ao número de folhas, não se observou diferença significativa entre os dias avaliados (Tabela 2). A porcentagem de sobrevivência das plantas, durante os 30 dias de aclimatização, foi de 86,66% (Figura 6).

TABELA 2. Média dos parâmetros analisados em plântulas, no início da aclimatização e após 30 dias, para as variáveis formação de raiz, número de folhas e tamanho da parte aérea (PA).

Dias de aclimatização	Raiz *	Nº folhas	Tam PA
0	0,36 b	3,6 a	3,88 a
30	0,8 a	4,16 a	14,7 b

* Letras iguais não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, a 5% de significância.



FIGURA 6. (A) Plântulas obtidas via organogênese indireta de *Passiflora gibertii*, no primeiro dia de aclimatização. (B) Plântulas no sétimo dia de aclimatização. (C) Plântulas 40 dias após o início da aclimatização, já transferidas para a casa de vegetação.

Becerra et al. (2004), ao descreverem um protocolo para a regeneração de brotos *in vitro* a partir de discos foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, observaram maior produção de novo de brotos em explantes de plantas com dois meses de idade, cultivadas em meio MS suplementado com 3% de sacarose, 4,44 μM de BAP e 2,32 μM de CIN. Estes autores observaram também que os brotos regenerados enraizaram espontaneamente em meio livre de reguladores de crescimento e foram aclimatizados com sucesso em condições de casa de vegetação.

Em *Passiflora suberosa*, Monteiro et al. (2000) observaram a organogênese em discos foliares cultivados em meio suplementado com 2,22 ou 4,44 μM de BAP, depois de 4 a 8 semanas de cultivo. Após a indução, os calos foram transferidos para meio suplementado com 2,88 μM de GA_3 , no qual ocorreram o desenvolvimento, o alongamento e o enraizamento dos brotos obtidos via organogênese indireta.

Biasi et al. (2000) verificaram que o uso do meio MS com metade de sua força iônica foi efetivo para o enraizamento dos brotos obtidos via organogênese indireta, a partir de segmentos internodais de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Resultados similares foram ainda obtidos por Dornelas & Vieira (1994). Moran Robles (1978), Kantharajah & Dodd (1990) e Dornelas & Vieira (1994) já haviam comentado previamente a ausência de reguladores de crescimento para o enraizamento *in vitro* de espécies de *Passiflora*.

González et al. (1997) também obtiveram sucesso no estabelecimento e no crescimento de plantas obtidas *in vitro* via organogênese indireta, a partir de explantes foliares e hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, com taxa de sobrevivência de 95% a 100%. Após a aclimatização, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação e, finalmente, para o campo, onde exibiram desenvolvimento vegetativo e floral normal.

4 CONCLUSÕES

A concentração de 43,2 μM de CIN é efetiva para a formação de brotos adventícios em meio de indução, contudo, a sua ausência favorece a formação de raízes.

O meio de cultivo suplementado com 32,4 μM de CIN proporciona maior formação de calos. A calogênese está positivamente relacionada com a formação de brotos.

O meio suplementado com 21,6 μM de CIN e 28,86 μM de GA_3 é o mais indicado para o alongamento dos brotos originados a partir de calos organogênicos na espécie de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown.

O meio MS com metade da concentração de seus sais é eficiente para o enraizamento dos brotos adventícios obtidos a partir de calos organogênicos.

A aclimatização de *Passiflora gibertii* foi eficaz, resultando em taxa elevada de sobrevivência *ex vitro* (86,66%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUGUNE, N. O.; GOPALAN, H. N.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 1, n. 2, p. 99-104, 1993.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. A.; VIEIRA, M. L.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, Nov. 1999.

ARIGITA, L.; FERNÁNDEZ, B.; GONZÁLEZ, A. TAMÉS, R. S. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 2, p. 161-167, Feb. 2005.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GONGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 87-90, Oct. 2004.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 661-665, out./dez. 2000.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 515-519, June 1988.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 211-217, Feb. 1994.

FIGUEIREDO, M. A. de; PAIVA, R.; SOUZA, A. C. de; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

GONZÁLES, A.; ARIGITA, L.; MAJADA, J.; SÁNCHEZ TAMÉS, R. Ethylene involvement in *in vitro* organogenesis and plant growth of *Populus tremula* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 1-6, June 1997.

GUO, Y. M.; YANG, Y. G.; GUO, Y.; GUO, Z. C. Adventitious shoot bud formation and plant regeneration from *in vitro* cultured stem segments of reed (*Phragmites communis* Trin.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 412-415, July/Aug. 2004.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGINS, C. M.; DIETZGEN, R. G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* × *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, n. 5, p. 673-680, 2000.

ISUTSA, D. K. Rapid micropapagation of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 395-400, Feb. 2004.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 337-339, Mar. 1990.

KOROCH, A.; JULIANI, H. R.; KAPTEYN, J.; SIMON, J. E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 79-83, Apr. 2002.

LIMA, D. M. de; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 359-363, mar./abr. 2000.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008.

LOMBARDI, S. P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I. R. da S.; NOGUEIRA, M. C. S. APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 239-247, Mar. 2007.

MELETTI, L.; MAIA, M. L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 64 p.

MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; J. E.; HAMASAKI, R. M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 107-112, May/Aug. 2003.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N. e RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic médium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 36, n. 2, p. 327-531, Nov. 2000.

MORAN ROBLES, M. J. Multiplication vegetative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, n. 10, p. 693-699, Oct. 1978.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, L. A.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 82, n. 2, p. 311-315. 2008.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytikinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 12, p. 1002-1006, Sept. 1999.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 39, n. 6, p. 618-622, Nov. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, K. I.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Kluwer Academic: Netherlands, 1994. p. 17-36.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; ANAND, R. P.; RAMESH ANBAZHAGAN, V. R. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuate*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 23-28, Apr. 2000.

WADEGAONKAR, P. A.; BHAGWAT, K. A.; RAI, M. K. Direct rhizogenesis and establishment of fast growing normal root organ culture of *Withania somnifera* Dunal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 223-225, Feb. 2006.

ZIMMERMAN, R. H.; SWARTZ, H. J. *In vitro* culture of temperate fruits. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 457-474

CAPÍTULO 3

ORGANOGENESE INDIRETA DE MARACUJAZEIRO NATIVO EM FUNÇÃO DO USO DE BAP COMBINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA E NITRATO DE PRATA

RESUMO

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Organogênese indireta de maracujazeiro nativo em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata. In: _____. **Organogênese indireta de maracujazeiro nativo**. 2008. Cap.3, p. 40-66. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

A micropropagação oferece vantagens, como a produção rápida e uniforme de plantas livres de doenças. A morfogênese *in vitro* depende não somente dos produtos químicos presentes no meio nutritivo, mas também da composição da atmosfera nos recipientes de cultura. O acúmulo de etileno na cultura de tecidos é consequência do método. O seu papel na cultura de tecidos de plantas tem sido estudado por meio da adição de inibidores de etileno ao meio de cultivo. O nitrato de prata é um potente inibidor da ação do etileno e este tem sido mencionado com importante na produção de brotos em diversas espécies. O objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de indução e alongamento de brotos adventícios em calos organogênicos de maracujazeiro nativo. Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas *in vitro* foram excisados em segmentos de $\approx 1 \text{ cm}^2$, foram efetuados pequenos cortes em sua superfície abaxial e estes foram inoculados em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com água de coco (5%), sacarose (3%) e diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM). Após a inoculação, estes explantes foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. O número de brotos e a formação de calos foram avaliados. Os calos obtidos foram transferidos para meio $\frac{1}{2}$ MS acrescido de água de coco (5%), sacarose (3%) e suplementado com 4,44 μM de BAP, para a formação de brotos. Após a inoculação, estes explantes foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias. Para testar o efeito do nitrato de prata na organogênese *in vitro* de *Passiflora gibertii*, explantes foliares foram inoculados em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com água de coco (5%), sacarose (3%) e 4,44 μM de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA (0,054;

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (C-orientadora).

0,54; 5,4 μM), na ausência e na presença de 23,54 μM de AgNO_3 . O nitrato de prata foi microfiltrado com filtro milipore 0,2 μm e adicionado ao meio de cultura autoclavado. Após a inoculação, estes explantes foram mantidos em sala de crescimento, por 60 dias. O número de brotos e a formação de calos foram avaliados. Calos obtidos foram transferidos para meio $\frac{1}{2}$ MS acrescido de sacarose (3%). Nos tratamentos em que se empregou AgNO_3 anteriormente, este composto foi mantido. Após inoculação, os calos organogênicos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias. A presença de BAP foi efetiva para a indução de calos e brotos adventícios, sendo a concentração de 8,88 μM de BAP indicada para a formação de brotos adventícios a partir de explantes foliares em meio de indução. A concentração de 2,22 μM de BAP proporciona maior calogênese. A presença de AgNO_3 favorece a formação de brotos na concentração de 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. A calogênese é beneficiada pela adição de AgNO_3 ao meio de cultura, sendo esta maior na presença de 5,4 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. A concentração de 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BAP do meio de indução é mais efetiva para o posterior alongamento dos brotos.

ABSTRACT

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Indirect organogenesis of *Passiflora gibertii* N. E. Brown using BAP combined with different concentrations of NAA and silver nitrate. In: _____. **Indirect organogenesis of native passion fruit**. 2008. Chap. 3, p. 40-66. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, MG.*

The micropropagation presents advantages such as the fast and uniform production of plants free of diseases. The *in vitro* morphogenesis depends not only of chemical products present on nutritive medium, but also the atmosphere composition in the culture vessels. The accumulation of ethylene in the culture vessels is a consequence. Its role in the plant tissue culture has been studied through the addition of inhibitors to the cultivation medium. Silver nitrate is a strong inhibitor of the ethylene action and has been mentioned as important in the production of shoots in several species. The objective of this work was to optimize the protocol of organogenic callus induction of native passion fruit and the development of the adventitious formed shoots. Leaf explants obtained from *in vitro* seedlings were excised in segments of $\approx 1 \text{ cm}^2$, it was made small cuts in their abaxial surface and inoculated in $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%) and different concentrations of BAP (0, 2.22, 4.44, 6.66 and 8.88 μM). After inoculation, these explants were maintained in growth room, under photons irradiance of $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and photoperiod of 16 hours, for 60 days. The number of shoots and the formation of callus were evaluated. The obtained callus were transferred to $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%) and 4.44 μM BAP for the formation of shoots. After inoculation, these explantes were maintained in growth room for 30 days. In order to verify the effect of silver nitrate on *in vitro* organogenesis leaf explants were inoculated in $\frac{1}{2}$ MS supplemented with coconut water (5%), sucrose (3%) and 4.44 μM BAP combined with different concentrations of NAA (0.054, 0.54, 5.4 μM) in the absence and presence of 23.54 μM AgNO_3 . The silver nitrate was microfiltered with milipore filter of 0.2 μm , and added to the autoclaved culture medium. After inoculation, these explants were maintained in growth room for 60 days. The number of shoots and the formation of callus were evaluated. Callus obtained were transferred to $\frac{1}{2}$ MS supplemented with sucrose (3%). Callus produced in the presence of AgNO_3 were not transferred to $\frac{1}{2}$ MS. After inoculation the organogenic callus were maintained in growth room for 30 days.

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - (Adviser); Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser).

The presence of BAP was effective for the induction of callus and adventitious shoots, with the concentration of 8.88 μM BAP recommended for the formation of adventitious shoots from leaf explants inoculated in the induction medium. The concentration of 2.22 μM BAP promotes higher formation of callus. The presence of AgNO_3 favors the formation of shoots in the concentration of 0.054 μM NAA and 4.44 μM BAP. The formation of callus is favored by the addition of AgNO_3 , which is higher in the presence of 5.4 μM NAA and 4.44 μM BAP. The concentration of 0.054 μM NAA and 4.44 μM BAP in the induction medium is more effective for shoot elongation.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* tem 530 espécies descritas (Bernacci et al., 2003), sendo mais de 150 nativas do Brasil e cerca de 60 utilizadas na alimentação humana (Oliveira et al., 1994). O Brasil é, atualmente, o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, tendo cultivado 34.778 ha, em 2002. Destacam-se como principais produtores nacionais os estados da Bahia, Sergipe, São Paulo, Pará e Minas Gerais (Agrianual, 2004).

O maracujazeiro tem grande importância no setor agrícola, devido às características físico-químicas e farmaco-terapêuticas de suas frutas, à alta produtividade e à grande aceitação no mercado mundial. Apesar da importância da cultura, há ainda uma série de problemas fitossanitários que dificultam o seu cultivo, reduzindo a longevidade e a produtividade dos plantios (Torres Filho, 1985).

A propagação do maracujá é feita, predominantemente, por meio da reprodução sexuada (Meletti & Maia, 1999), a qual resulta em plantas com grande variabilidade genética e não uniformidade. Neste contexto, a cultura de tecidos de plantas se apresenta como importante ferramenta para se propagar genótipos superiores e resistentes às doenças (Reis et al., 2003).

A micropropagação confere vantagens, como a produção rápida e uniforme de plantas livres de doenças (Isutsa, 2004). A baixa qualidade das sementes e a falta de plantas livres de doenças podem prevenir a produção adequada e o suprimento de maracujazeiros. Assim, o aumento da disponibilidade de plantas saudáveis por meio da cultura de tecidos pode beneficiar a produção do maracujazeiro.

A grande maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Passiflora* foi realizada com *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, com ênfase na indução e na multiplicação de gemas a partir de segmentos

nodais, internodais e discos foliares (Monteiro-Hara, 2000). Segundo Takahashi (2002), a organogênese tem sido relatada para as espécies *Passiflora amethystina*, *Passiflora giberti*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora maliformis*, *Passiflora molissima*, *Passiflora nitida*, *Passiflora quadrangularis* e *Passiflora suberosa*.

A morfogênese *in vitro* depende não somente dos produtos químicos presentes no meio nutritivo, mas também da composição da atmosfera nos recipientes de cultura (Lai et al., 1998; Zobayed et al., 1999). O acúmulo de etileno nos recipientes de cultura de tecidos é consequência do método (Trevisan & Mendes, 2005). As condições de cultivo, associadas ao fato de o maracujá produzir etileno em altas taxas (Ludford, 1995), indicam que a possibilidade do acúmulo de etileno em recipientes de cultura de tecidos precisa ser levada em conta. O meio de cultura suplementado com inibidores que bloqueiam a produção ou ação do etileno pode aumentar a morfogênese em muitas espécies de plantas (Trevisan & Mendes, 2005).

O papel do etileno na cultura de tecidos de plantas tem sido estudado por meio da adição de precursores de etileno ou de inibidores ao meio de cultura. O nitrato de prata é um potente inibidor da ação do etileno, por meio da competição pelos sítios de ligação localizados na membrana intracelular (Naik & Chand, 2002). Ele tem sido mencionado com importante na produção de brotos em diversas espécies (Biasi et al., 2000; Reddy et al., 2001; Santana et al., 2008).

Este estudo foi realizado com o objetivo de obter a otimização do protocolo de indução de calos organogênicos e o alongamento dos brotos adventícios obtidos de maracujazeiro nativo, por meio da adição de nitrato de prata ao meio de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de BAP

2.1.1 Material vegetal

Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown – acesso CPAC MJ-22-01 da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), Planaltina, DF.

2.1.2 Calogênese

A região central das folhas foi excisada em segmentos de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuaram-se pequenos cortes em sua superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo metade da concentração de seus sais suplementada com água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120° C , durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e $8,88 \mu\text{M}$). Após a inoculação de um explante foliar em cada tubo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento, sob de irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias.

Avaliaram-se o número de brotos obtidos e a formação de calos nos explantes foliares. A presença de calos foi avaliada por meio de observações visuais, de acordo com as seguintes categorias: 0 = ausência de calos; 1 = explante entumescido; 2 = início da calogênese; 3 = 50% do explante coberto por calos e 4 = explante totalmente coberto por calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante

foliar. Para a variável formação de calos, os resultados foram analisados no programa estatístico SAS®, pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o escore médio de formação de calos. Na avaliação do efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a formação de brotos, a significância das diferenças entre as médias foi avaliada pelo teste de regressão, a 5% de significância, utilizando-se o software estatístico Sisvar®.

2.1.3 Organogênese

Os calos obtidos anteriormente foram transferidos para meio MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de água de coco (5%), sacarose (3%) e suplementado com 4,44 µM de BAP para a formação de brotos. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 e o meio solidificado com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120° C, durante 20 minutos. Após a inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2° C e fotoperíodo de 16 horas, por 30 dias.

2.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata

2.2.1 Material vegetal

Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown - acesso CPAC MJ-22-01 da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF.

2.2.2 Calogênese

Para a indução de calos, a porção central das folhas foi excisada em segmentos de ≈ 1 cm². Em seguida, foram efetuados pequenos cortes em sua

superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%), antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com $4,44 \mu\text{M}$ de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA na ausência e na presença de AgNO_3 (nitrato de prata): $4,44 \mu\text{M}$ BAP; $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $0,054 \mu\text{M}$ ANA; $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $0,54 \mu\text{M}$ ANA; $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $5,4 \mu\text{M}$ ANA; $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $23,54 \mu\text{M}$ AgNO_3 ; $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $0,054 \mu\text{M}$ ANA + $23,54 \mu\text{M}$ AgNO_3 ; $4,44 \mu\text{M}$ de BAP + $0,54 \mu\text{M}$ ANA + $23,54 \mu\text{M}$ AgNO_3 ; $4,44 \mu\text{M}$ de BAP + $5,4 \mu\text{M}$ ANA + $23,54 \mu\text{M}$ AgNO_3 . O nitrato de prata foi microfiltrado com filtro milipore de $0,2 \mu\text{m}$ e adicionado ao meio de cultura autoclavado. Após a inoculação de um explante foliar em cada tubo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias.

Avaliaram-se o número de brotos obtidos e a formação de calos nos explantes foliares. A presença de calos foi avaliada, por meio de observações visuais, de acordo com as seguintes categorias: 0 = ausência de calos; 1 = explante entumescido; 2 = início da calogênese; 3 = 50% do explante coberto por calos e 4 = explante totalmente coberto por calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante foliar. Para a variável formação de calos, os resultados foram analisados no programa estatístico SAS®, pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o escore médio de formação de calos. Ao se avaliar o efeito de diferentes combinações de BAP, ANA e AgNO_3 na formação de brotos, os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o

software estatístico Sisvar®. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, com significância fixada em 5%.

2.2.3 Organogênese

Calos obtidos anteriormente foram transferidos para meio MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de sacarose (3%). Nos tratamentos em que se empregou AgNO_3 , este foi mantido na mesma concentração. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos. Após inoculação, os calos organogênicos foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 30 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante foliar. Ao se avaliar o efeito de AgNO_3 na formação e no alongamento dos brotos, os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software estatístico Sisvar®, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott Knott, com significância fixada em 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de BAP

Após 60 dias de cultivo em meio de indução, organogênese indireta foi observada com a formação de múltiplos brotos ao longo dos explantes foliares de *Passiflora gibertii*. Os resultados obtidos em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP são mostrados na Figura 1.

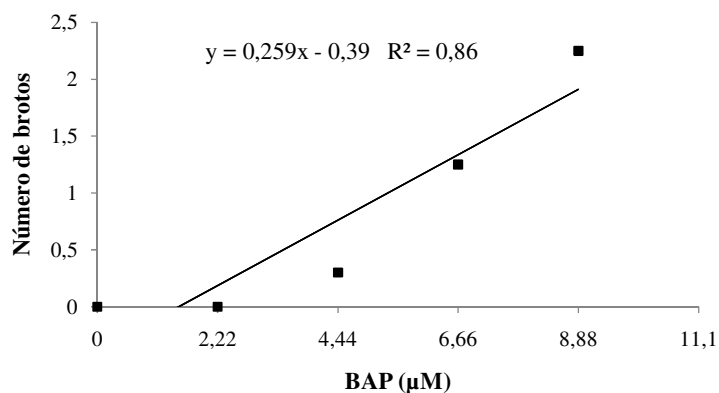


FIGURA 1. Número de brotos obtidos via organogênese indireta a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, empregando-se diferentes concentrações de BAP.

A formação de brotos via organogênese indireta não ocorreu na ausência e na presença de 2,22 µM de BAP; nas demais concentrações utilizadas, ele foi efetivo no desenvolvimento de brotos adventícios. O número de brotos foi maior em explantes foliares mantidos em meio suplementado com 8,88 µM de BAP, com média de 2,25 brotos por explante.

Diferentes concentrações de BAP foram utilizadas *in vitro* para a indução de brotos em discos foliares de *Passiflora cincinnata* Mast. Na ausência do regulador BAP, não foi observada a formação de brotos. Contudo, ao contrário do que foi observado no presente estudo, a formação de brotos via organogênese indireta ocorreu em maior frequência nos explantes foliares aos 28 dias em meio suplementado com 2,22 μM de BAP. No entanto, não foi observada diferença estatística entre este tratamento e quando se empregaram 6,66 μM de BAP (Lombardi et al., 2007).

Já em *P. edulis* f. *flavicarpa*, a organogênese indireta em explantes foliares foi descrita por Dornelas & Vieira (1994), que, aos 28 dias de cultivo em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP, observaram uma resposta regenerativa em 41,7% dos explantes. Monteiro et al. (2000) também observaram a organogênese em explantes foliares de *Passiflora suberosa* em meio MS suplementado com 2,22 ou 4,44 μM de BAP, depois de 4 a 8 semanas de cultivo.

O gráfico da Figura 2 mostra que ocorreu diferença significativa com relação à formação de calos entre as diferentes concentrações de BAP empregadas, aos 30 dias de cultivo. O menor escore médio (0) para a formação de calos foi observado na ausência de BAP. Nos demais tratamentos em que se empregaram diferentes concentrações de BAP ocorreu a formação de calos, que foi mais elevada na concentração de 2,22 μM de BAP.

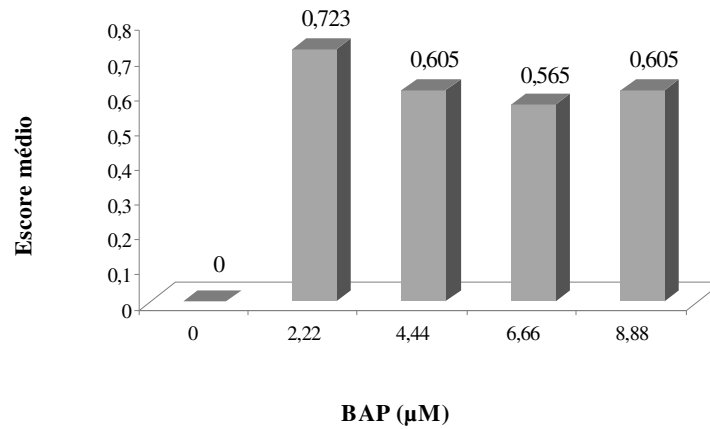


FIGURA 2. Formação de calos a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii* em meio suplementado com diferentes concentrações de BAP.

Estes resultados evidenciam que a utilização do regulador de crescimento BAP é necessária para induzir a calogênese em explantes foliares de *Passiflora gibertii*. Resultados semelhantes foram descritos por Lombardi et al. (2007), os quais relatam que, em *P. cincinnata*, a formação de brotos nos discos foliares foi observada após a formação de calos nas extremidades do explante, tendo a organogênese indireta ocorrido somente em meio de cultura contendo o regulador BAP.

Monteiro et al. (2000) também observaram a organogênese em explantes foliares de *Passiflora suberosa* em meio MS suplementado com 2,22 ou 4,44 µM de BAP, após 4 a 8 semanas de cultivo, em que os calos proliferaram a partir das extremidades dos discos foliares. No presente experimento, a avaliação dos explantes após 4 semanas em meio de indução, no escuro, mostrou resultados semelhantes. Na ausência de BAP não houve a formação de calo em nenhum dos explantes. Já nos tratamentos contendo BAP, observou-se a formação de calo em 100% dos explantes.

Biasi et al. (2000), ao estudarem a indução de organogênese em segmentos internodais do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivados em meio contendo de 4,44 μM a 17,76 μM de BAP, observaram que a proliferação de calos ocorreu na maioria dos explantes em todos os tratamentos, incluindo o grupo controle, principalmente nas extremidades das regiões onde se fez os cortes, tendo a proliferação de brotos ocorrido associada com a formação de calos.

3.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata

Foi observada diferença significativa quanto à formação de brotos em explantes foliares mantidos em meio na ausência ou presença de AgNO_3 , sendo esta maior na presença deste composto em meio suplementado com 0,054 μM de ANA. Com relação ao número médio de brotos dentro de cada concentração de ANA empregada, na presença e na ausência de AgNO_3 , somente na concentração de 0,054 μM de ANA verificou-se diferença significativa, exibindo número maior de brotos (1,93 brotos) em meio suplementado com AgNO_3 , em comparação com aquele sem este composto (0) (Figura 3).

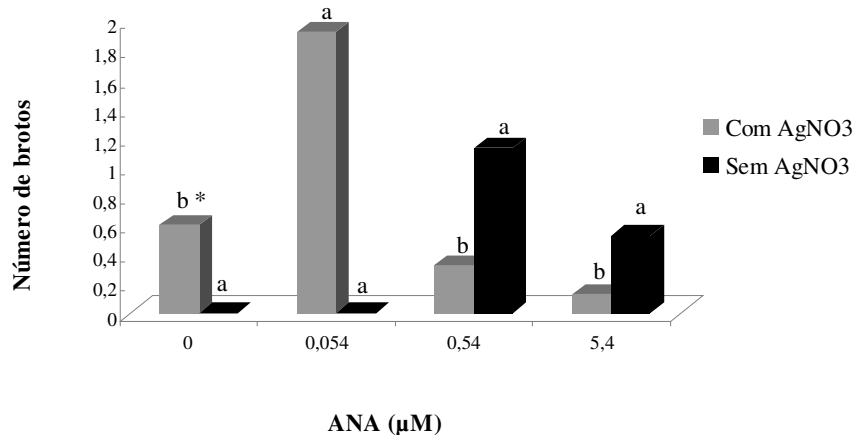


FIGURA 3. Número de brotos formados via organogênese indireta em explantes foliares do maracujazeiro nativo, avaliando-se o efeito de diferentes concentrações de ANA e a presença ou ausência de AgNO₃, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, com nível de significância fixado em 5%.

A organogênese *in vitro* do maracujazeiro-amarelo tem sido obtida a partir de explantes cultivados em meio suplementado somente com BAP, em combinação com ANA (Dornelas & Vieira, 1994).

Trevisan & Mendes (2005) observaram a organogênese *in vitro* do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) com a formação de gemas adventícias em explantes foliares cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP ou TDZ. Estes autores adicionaram AgNO₃ ao meio de cultura de indução de gemas adventícias para minimizar o efeito do acúmulo do etileno no desenvolvimento dos brotos. Eles observaram que tanto BAP quanto TDZ foram eficientes em promover o desenvolvimento de brotos e que, embora diferenças significativas no uso de AgNO₃ não tenham sido detectadas, gemas adventícias desenvolvidas em meio de cultura suplementado com AgNO₃ eram mais vigorosas.

Reguladores de crescimento em combinação com inibidores do etileno para melhorar a morfogênese têm sido utilizados em papaia (Lai et al., 1998), couve-flor (Zobayed et al., 1999) e pepino (Mohiuddin et al., 1997). Para o maracujazeiro amarelo, Faria & Segura (1997b) verificaram aumento na frequência de brotos com o uso de tiosulfato de prata (STS) na cultura de tecidos de explantes foliares e hipocotiledonares.

Concentrações decrescentes de etileno em resposta a íons de prata foram também verificadas em diversas espécies (Chi et al., 1991; Santos et al., 1997), incluindo o maracujazeiro (Barbosa et al., 2001). Os resultados obtidos por estes autores mostram que a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é muito sensível ao etileno e que seu acúmulo pode induzir a senescência nas culturas de maracujazeiro, podendo também limitar a morfogênese *in vitro* desta espécie.

Faria & Segura (1997a) demonstraram que a adição de tiosulfato de prata ao meio de cultura aumentou significativamente a diferenciação e o desenvolvimento de brotos adventícios no maracujazeiro. O uso de recipientes de cultivo *in vitro* com sistema de ventilação também tem sido mencionado como uma alternativa para modificar a atmosfera dos frascos de cultivo *in vitro*, a fim de melhorar as trocas gasosas (Zobayed et al., 1999).

Faria & Segura (1997) e Barbosa et al. (2001) notaram, ainda, que o tiosulfato de prata não afetou a porcentagem de hipocótilos produzindo brotos. Em contraste, este composto aumentou significativamente a frequência de brotos nos explantes foliares, quando adicionado a um meio suplementado com 8,8 μM de BAP e 2,7 μM de AIA.

A formação de calos foi estatisticamente significativa entre os tratamentos, apresentando escore médio maior nos tratamentos em que se empregou nitrato de prata (AgNO_3). O escore médio de formação de calos, tanto na presença quanto na ausência de AgNO_3 , aumentou juntamente com o

aumento da concentração de ANA (Figura 4), evidenciando que o uso de ANA e AgNO_3 também pode influenciar na calogênese da espécie *Passiflora gibertii*.

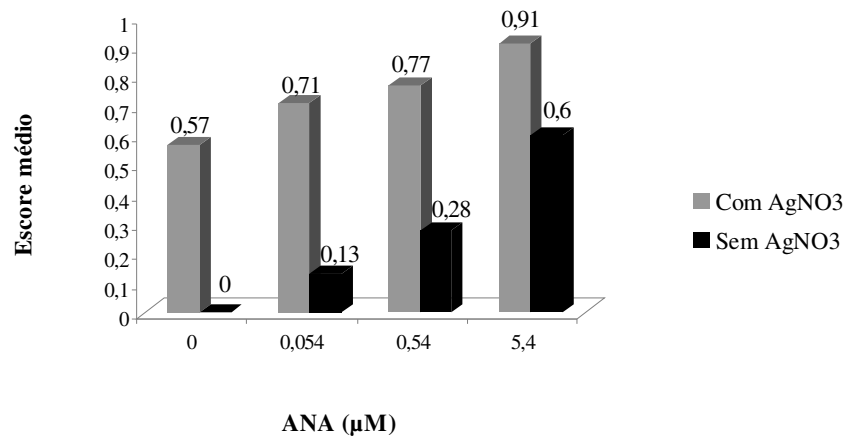


FIGURA 4. Formação de calos em explantes foliares, avaliando-se o efeito de diferentes concentrações de ANA e a presença ou a ausência de nitrato de prata, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Pacheco et al. (2008) verificaram que segmentos foliares de *Arachis stenosperma* cultivados em meio MS suplementado com ANA e BAP mostraram alta frequência de calogênese (100%), independente da concentração de BAP e de sua combinação com ANA. Por outro lado, folhas inteiras mostraram altas frequências de formação de calos (100%) somente em resposta a 30,8 μM de BAP ou a combinação de ANA com 4,4 μM de BAP.

Naik & Chand (2002), em estudo empregando etileno em culturas de calos de girassol e fumo, o etileno mostrou inibir a regeneração de brotos nestes. Outros autores, utilizando um precursor de etileno, 1-aminociclopropane-1-carboxylic acid (ACC), verificaram o efeito negativo do etileno na morfogênese em culturas de calos de milho (Songstad et al., 1988). Além disso, como verificado neste estudo, em diversas espécies, como repolho chinês (Chi et al., 1991), mostarda (Pua & Chi, 1993), arroz (Adkins et al., 1993) e trigo

(Purnhauser et al., 1987), também houve aumento no crescimento e diferenciação da cultura de células quando a produção de etileno foi inibida ou sua ação sofreu interferência com o uso de diversos inibidores de etileno.

Estas observações experimentais sugerem que a regeneração de espécies pode ser, pelo menos em parte, influenciada pela presença de altos níveis de etileno na cultura.

Calos organogênicos mantidos durante 30 dias em meio MS, com metade de sua força iônica na ausência de AgNO_3 , apresentaram maior número de brotos. Contudo, esse número não diferiu estatisticamente do observado em meio na presença deste composto (Figura 5).

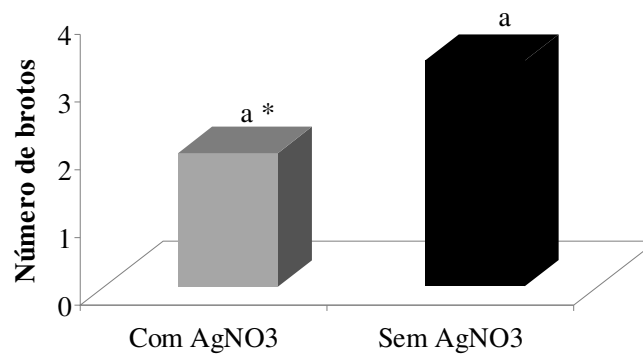


FIGURA 5. Número de brotos formados via organogênese indireta, após a transferência para meio MS, avaliando-se a presença ou a ausência de nitrato de prata, após 30 dias. * Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, com nível de significância fixado em 5%.

Trevisan & Mendes (2005), estudando o efeito do nitrato de prata combinado com BAP ou TDZ na organogênese *in vitro* do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.), também não observaram diferença significativa na proporção de explantes responsivos ao uso de AgNO_3 .

Contudo, estes autores observaram que os brotos adventícios desenvolvidos em meio suplementado com nitrato de prata eram mais vigorosos que aqueles desenvolvidos na ausência deste composto.

Quando foram analisados os tratamentos de origem dos calos transferidos para meio MS, desconsiderando-se a presença ou a ausência de nitrato de prata, verificou-se que aqueles calos organogênicos induzidos em meio suplementado com 4,44 μM de BAP combinado com 0,054 μM de ANA apresentaram maior número de brotos, diferindo estatisticamente de todas as demais concentrações de ANA empregadas (Figura 6).

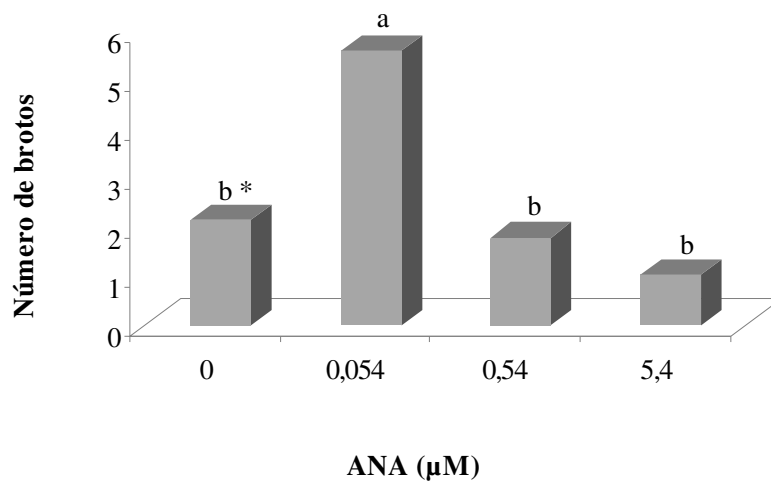


FIGURA 6. Número de brotos formados via organogênese indireta, avaliando-se o efeito da origem do meio de indução com diferentes concentrações de ANA, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, com nível de significância fixado em 5%.

Na obtenção de brotos adventícios via organogênese direta da espécie *Punica granatum* L., o uso de BAP pode induzir a formação de brotos

adventícios, mas em uma frequência baixa. Um suplemento com ANA foi benéfico para a formação de brotos adventícios. Os melhores resultados foram obtidos na combinação de 8,9 μM de BAP, com 5,4 μM de ANA. A combinação de ANA e BAP também foi benéfica para muitas espécies de árvores frutíferas (Zimmerman & Swartz, 1994).

O gráfico da Figura 7 evidencia a ação do nitrato de prata, um inibidor da ação do etileno, no vigor dos brotos formados via organogênese indireta, no maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii*. O alongamento dos brotos foi maior em explantes mantidos no meio de indução suplementado com 0,054 μM de ANA e mantidos em meio MS na presença de nitrato de prata, em que os brotos apresentaram, em média, 1 cm de comprimento. O alongamento dos brotos de explantes foliares mantidos em meio de indução suplementado com as demais concentrações de ANA e na ausência e na presença de nitrato de prata não diferiram estatisticamente entre si.

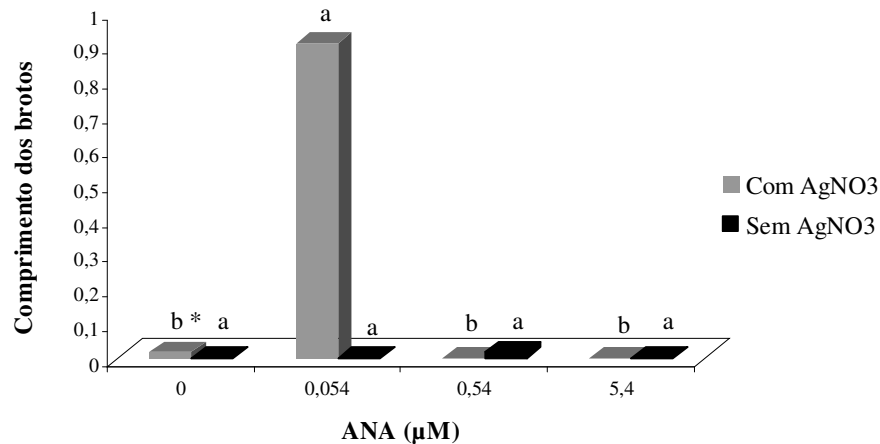


FIGURA 7. Comprimento médio dos brotos formados via organogênese indireta, avaliando-se o efeito da origem do meio de indução com diferentes concentrações de ANA, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, na presença e na ausência de AgNO₃. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, quanto ao teste de Scott Knott, com nível de significância fixado em 5%.

Trevisan & Mendes (2005) observaram que, em brotos obtidos via organogênese indireta do maracujazeiro-amarelo, em meio de cultura suplementado com TDZ + AgNO₃, se desenvolveram plantas após transferência para meio de alongamento. Houve maior número de explantes com brotos na presença de AgNO₃ e maior eficiência no alongamento desses brotos quando se utilizaram tampas ventiladas. Faria & Segura (1997a) também mencionam que a capacidade morfo genética do maracujazeiro *P. edulis* foi limitada pelo acúmulo de etileno nos frascos de cultivo.

A inibição da organogênese *in vitro* afetada pelo etileno tem sido verificada em diversas espécies e rotas morfo genéticas (Reis et al., 2003). Estes autores observaram que, em brotos axilares cultivados *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener, a inibição da ação e biossíntese do etileno estimulou o desenvolvimento de brotos, com um significativo aumento no

número de brotos desenvolvidos por explante e da área foliar média, em comparação com o tratamento controle.

A ação do etileno sobre a morfogênese *in vitro* do maracujazeiro foi verificada também por Faria & Segura (1997b) e Barbosa et al. (2001). Estudos conduzidos por estes autores indicaram que a aplicação de tiosulfato de prata não afetou a porcentagem de hipocótilos produzindo brotos. Em contraste, o composto aumentou significativamente a frequência de brotos em explantes foliares, quando estes foram cultivados em meio MS suplementado com 8,88 μM de BAP e 2,7 μM de ANA.

4 CONCLUSÕES

A presença de BAP foi eficiente para a indução de calos e de brotos adventícios. A concentração de 8,88 μM de BAP é indicada para a formação de brotos adventícios a partir de explantes foliares em meio de indução. A concentração de 2,22 μM de BAP proporciona maior calogênese.

A presença de AgNO_3 favorece a formação de brotos na concentração de 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. A calogênese é beneficiada pela adição de AgNO_3 ao meio de cultura, sendo esta maior na presença de 5,4 μM de ANA e 4,44 μM de BAP.

A concentração de 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BAP do meio de indução é mais efetiva para o posterior alongamento dos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 44, n. 269, p. 1829-1835. Dec. 1993.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA –
AGRIANUAL. São Paulo: FNP, 2004.

BARBOSA, W. M.; OTONI, W. C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A. A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursors and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 7, n. 3, p. 47-51, Sept. 2001.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. & SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data de publicação de *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 355-356, dez. 2003.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 661-665, out./dez. 2000.

CHI, G. L.; PUA, E. C.; GOH, C. J. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 178-183, May 1991.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 211-217, Feb. 1994.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 33, n. 3, p. 209-212, July/Sept. 1997a.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, Dec. 1997b.

ISUTSA, D. K. Rapid micropapagation of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 395-400, Feb. 2004.

LAI, C. C.; YU, T. A.; YEH, S. D.; YANG, J. S. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p.221-225, 1998.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. da S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 239-247, Mar. 2007.

LUDFORD, P. M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.725-750.

MELETTI, L.; MAIA, M. L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 64 p.

MOHIUDDIN, A. K. M.; CHOWDHURY, M. K. U.; ABDULLAH, Z. C.; NAPIS, S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p.75-78, 1997.

MONTEIRO, A. C. B. A. de ; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 571-573, jul./set. 2000.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 4, p. 423-430, Sept. 2002.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; CENTURION, M. A. P. C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R.; MAURO, A. O.; SACRAMENTO, C. K. Avaliação de Passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador: SBF, 1994. v. 3, p. 827.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, L. A.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 82, n. 2, p. 311-315, 2008.

PUA, E. C.; CHI, G. L. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, n. 3, p. 467-474, July 1993.

PURNHAUSER, L.; MEDGYESY, P.; DIX, P. J.; MÁRTON, L. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, n.1, p.1-4, Feb. 1987.

REDDY, B. O.; GIRIDHA, R. P.; RAVISHANKAR, G.A. *In vitro* rooting of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn an endangered shrub, by auxins and root-promoting agents. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 11, p. 1479-1482, Dec. 2001.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 39, n. 6, p. 618-622, Nov. 2003.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, jan./fev. 2008.

SANTOS, K. G. B.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genotype specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, n. 12, p. 859-864, Dec. 1997.

SONGSTAD, D. D.; DUNCAN, D. R.; WIDHOLM, J. M. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 4, p. 262-265, June 1988.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TORRES FILHO, J. Doenças do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) na região da Ibiapaba, Ceará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 2, p. 223, jun. 1985.

TREVISAN, F. MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 346-350, jul./ago. 2005.

ZIMMERMAN, R. H.; SWARTZ, H. J. *In vitro* culture of temperate fruits. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant Cell and Tissue Culture**, Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 457-474.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of a closed system, diffuse and humidity-induced convective through flow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 113-123, 1999.

CAPÍTULO 4

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS CALOS ORGANOGÊNICOS DE MARACUJAZEIRO NATIVO

RESUMO

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Características estruturais dos calos organogênicos de maracujazeiro nativo. In: _____. **Organogênese indireta de maracujazeiro nativo**. 2008. Cap. 4, p. 67-93. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados por análises ao microscópio eletrônico e ao microscópio óptico, permitindo a caracterização das modificações celulares e a atividade de organelas durante os processos, bem como a identificação dos tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicas. O objetivo deste estudo foi caracterizar, morfológica e anatomicamente, a organogênese indireta em explantes foliares de *Passiflora gibertii*. A 5ª folha do ápice foi utilizada como fonte de explante para a caracterização do explante. Para as análises anatômicas, as amostras foram preparadas de acordo com técnicas usuais de microscopia óptica. Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, as folhas foram fixadas em Karnovsky e preparadas para a visualização em microscópio eletrônico. Calos organogênicos induzidos em meio ½ MS suplementado com diferentes concentrações de CIN foram transferidos para meio ½ MS suplementado com CIN combinada com ANA e GA₃. Estes calos foram utilizados para as análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Calos organogênicos induzidos em meio de cultura ½ MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP, foram utilizados para as análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Calos organogênicos induzidos em meio ½ MS suplementado 4,44 µM de BAP, combinado com diferentes concentrações de ANA na ausência e presença de AgNO₃, foram utilizados para as análises de microscopia óptica. Os resultados mostram que a folha do maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* é hipoestomática, com estômatos anomocíticos. Análises de microscopia eletrônica de varredura dos calos organogênicos são essenciais para diferenciar brotos adventícios de primórdios foliares. Um padrão morfológico de desenvolvimento de brotos

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-orientadora).

similar foi observado por meio de análises anatômicas dos calos organogênicos induzidos em meio de cultivo suplementado com CIN, ANA e GA₃ e com BAP e ANA na presença e na ausência de AgNO₃. Na região em que ocorreu a formação de brotos, houve a predominância de células rediferenciadas a partir do calo, com aspecto uniforme em estrutura organizada.

ABSTRACT

CAMPOS, Ana Carolina Atala Lombelo. Structural characteristics of the organogenic callus of native passion fruit. In: _____. **Indirect organogenesis of native passion fruit**. 2008. Chap. 4, p. 67-93. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, MG.*

The *in vitro* regeneration processes in plants can be evaluated and characterized through analyses using electronic and optical microscopy, allowing the characterization of cellular modifications and the activity of organelles during the processes, as well as the identification of cells and areas in the explant that are potentially morphogenetic. The objective of this study was to characterize morphologically and anatomically the indirect organogenesis in leaf explants of *Passiflora gibertii*. The 5th leaf from the apex was used as explant source for the explant characterization. For the anatomical analyses, samples were prepared according to the usual techniques of optical microscopy. For electronic scanning microscopy analyses the leaves were fixed in Karnovsky and prepared to be visualized in the electronic microscopy. Organogenic callus induced in ½ MS medium supplemented with different concentrations of kinetin were transferred to ½ MS medium supplemented with kinetin combined with NAA and GA₃. These callus were used for the analyses of electronic scanning microscopy and optical microscopy. Organogenic callus induced in ½ MS culture medium, supplemented with different concentrations of BAP were used for the analyses of electronic scanning microscopy and optical microscopy. Organogenic callus induced in ½ MS medium supplemented with 4.44 µM BAP combined with different concentrations of NAA in the absence and presence of AgNO₃ were used for the analyses of optical microscopy. The results show that native passion fruit *Passiflora gibertii* leaf is hypostomatic, with anomocytic stomata. Scanning electron microscopy analyses are essential to differ adventitious shoots from leaf primordia. Similar morphologic pattern of development was observed in shoots through the morphological analyses of the organogenic callus induced in cultivation medium supplemented with kinetin, NAA and GA₃ and with BAP and NAA in the presence and absence of AgNO₃. In the shoot formation area, it is observed the predominance of re-differentiated cells from callus, with uniform aspect in an organized structure.

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva (Adviser); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais centros de dispersão da variabilidade genética do gênero *Passiflora*. A auto-incompatibilidade deste gênero, aliada à incidência de doenças no sistema radicular e na parte aérea, aos desmatamentos e aos monocultivos, promove perda de material genético (Faria et al., 2007). Dessa forma, a descrição e a otimização dos protocolos de cultura de tecidos são importantes para a definição de estratégias objetivando a multiplicação em larga escala e a transformação genética (Biasi et al., 2000).

A cultura de tecidos pode contribuir para a obtenção de plantas com características agronômicas desejáveis, técnicas de micropropagação, hibridização somática ou transformação genética, associadas a programas de melhoramento genético. A indução da organogênese ou a embriogênese somática na presença ou na ausência de uma fase de calo têm a finalidade de regenerar plântulas a partir de células transformadas, após a introdução de genes de interesse (Figueiredo et al., 2007).

Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos de microscopia eletrônica podem auxiliar na verificação da via de regeneração, diferenciando-se organogênese de embriogênese somática. Caracterizando-se a via de regeneração, podem-se também estabelecer melhores condições de cultivo, para a determinação de protocolos eficientes para indução e obtenção de plantas. Secções histológicas seriadas, além de permitir a observação da formação de gemas adventícias ou de embriões somáticos, definindo-se se são formados direta ou indiretamente, permitem caracterizar as modificações celulares e a atividade de organelas durante os processos, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos (Monteiro-Hara, 2000).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente a organogênese indireta em explantes foliares de *Passiflora gibertii*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Explantos foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown – acesso CPAC MJ-22-01 da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF.

2.2 Caracterização do explante

Para anatomia óptica, foram escolhidas, ao acaso, 5 plantas cultivadas em campo. De cada uma, retirou-se a 5ª folha, contando a partir do ápice, estas foram fixadas em álcool 70% (v/v), por 72 horas. Os cortes foram efetuados nos segmentos de 0,5 cm² da região mediana. Os cortes paradérmicos foram feitos à mão livre. As seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v), por um período de 3 a 5 minutos e realizadas duas lavagens em água destilada. Utilizou-se azul de toluidina para corar os cortes. Para os cortes transversais, o material foi submetido aos procedimentos usuais de microtécnica vegetal (Sass, 1951) e, após inclusão em parafina histológica, foi seccionado ao micrótomo rotativo Spencer, na espessura média de 15 µm. A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada pelo processo de dupla coloração com safranina-azul de Astra (Kraus & Arduin, 1977). Finalmente, foram montadas lâminas semipermanentes do material obtido com água glicerinada 50% (v/v), no caso dos cortes paradérmicos e lâminas permanentes com bálsamo do Canadá.

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura foram escolhidas, ao acaso, 5 plantas cultivadas em casa de vegetação. De cada uma, retirou-se a 5ª folha contando a partir do ápice, estas foram fixadas em Karnovsky modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,2], por um período de, pelo menos, 24 horas, à temperatura

ambiente. Posteriormente, as folhas foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05M, por 4 horas.

Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos e três vezes com 100%, por 10 minutos cada). Após a desidratação, foi realizada secagem em aparelho de ponto crítico CPD 030, por meio de CO₂ líquido e as amostras metalizadas com ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20kV (Alves, 2004).

2.3 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina

A região central das folhas foi excisada em segmentos de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuaram-se pequenos cortes em sua superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com água de coco (5%) e sacarose (3%). Para a indução de calos organogênicos, empregaram-se diferentes concentrações de cinetina (0; 10,8; 21,6; 32,4 e 43,2 μM). Após inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 90 dias.

Os calos obtidos anteriormente foram transferidos para meio MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de água de coco (5%) e sacarose (3%) e suplementado com cinetina combinada com ANA e GA₃, resultando nas seguintes combinações: 0; 21,6 μM CIN; 21,6 μM CIN + 0,54 μM ANA; 21,6 μM CIN + 28,86 μM GA₃ e 21,6 μM CIN + 0,54 μM ANA + 28,86 μM GA₃. Após inoculação, esses foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e

fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. Esses calos (Figura 1) foram utilizados para as análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica.

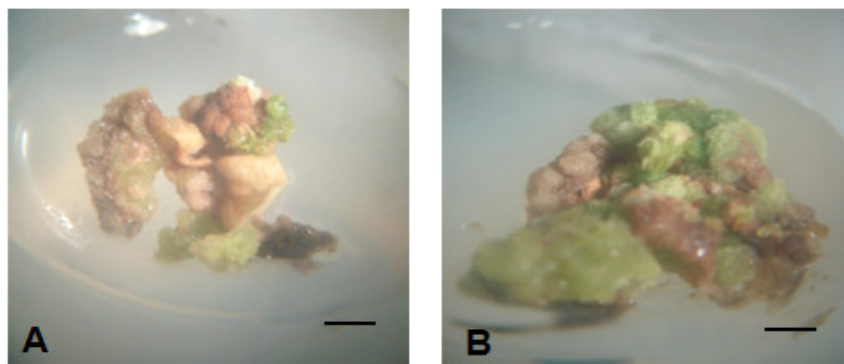


FIGURA 1. Calos cultivados em meio contendo 21,6 μM CIN e 28,86 μM GA₃. Barra = 3 mm.

2.4 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de BAP

A região central das folhas foi excisada em segmentos de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuaram-se pequenos cortes em sua superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%) antes da autoclavagem, a 120° C , durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM). Após inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. Os calos obtidos neste experimento (Figura 2) foram utilizados para a análise de microscopia de varredura e microscopia óptica.

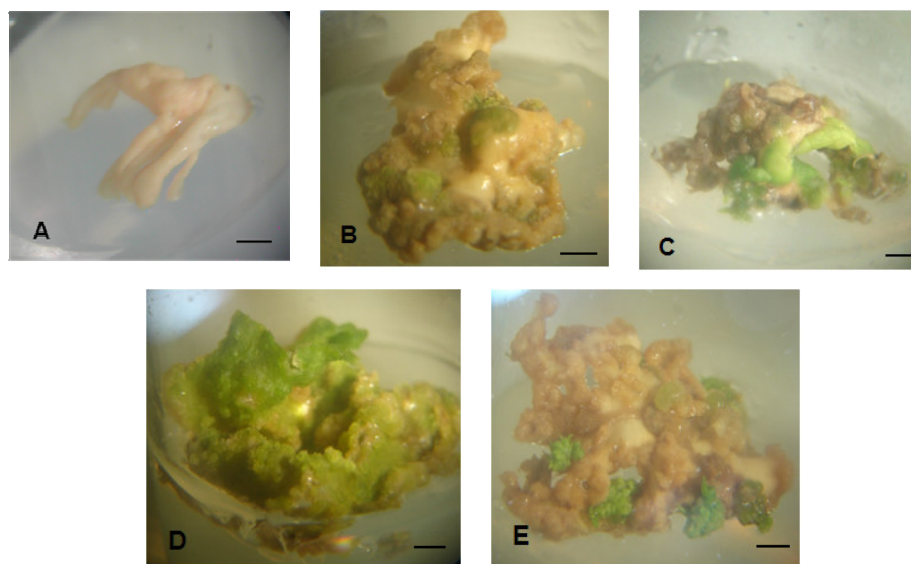


FIGURA 2. Calos organogênicos, aos 30 dias de cultivo em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com (A) 0; (B) 2,22 μ M BAP; (C) 4,44 μ M BAP; (D) 6,66 μ M BAP e (E) 8,88 μ M BAP, mostrando primórdios foliares originados a partir da superfície de protuberâncias. Barras = 3 mm.

2.5 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata

A região central das folhas foi excisada em segmentos de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuaram-se pequenos cortes em sua superfície abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%) antes da autoclavagem, a 120° C , durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com 4,44 μ M de BAP, combinado com diferentes concentrações de ANA, na ausência e na presença de AgNO_3 , resultando nas seguintes combinações: 4,44 μ M BAP; 4,44 μ M BAP + 0,054 μ M ANA; 4,44 μ M BAP +

0,54 μM ANA; 4,44 μM BAP + 5,4 μM ANA; 4,44 μM BAP + 23,54 μM AgNO_3 ; 4,44 μM BAP + 0,054 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; 4,44 μM de BAP + 0,54 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; 4,44 μM de BAP + 5,4 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 . O nitrato de prata foi microfiltrado com filtro millipore 0,2 μm e adicionado ao meio de cultura autoclavado. Após inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento sob de irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 60 dias. Os calos obtidos (Figura 3) foram utilizados para as análises de microscopia óptica.

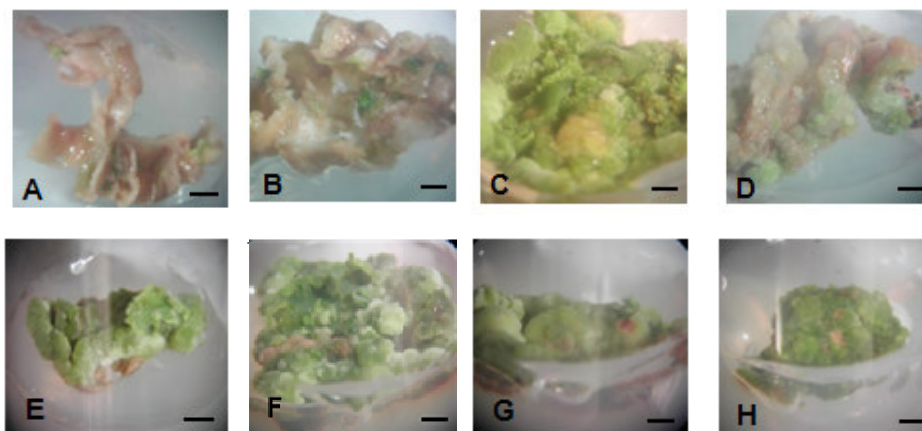


FIGURA 3. Calos organogênicos aos 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com (A) 4,44 μM BAP; (B) 4,44 μM BAP + 0,054 μM ANA; (C) 4,44 μM BAP + 0,54 μM ANA; (D) 4,44 μM BAP + 5,4 μM ANA; (E) 4,44 μM BAP + 23,54 μM AgNO_3 ; (F) 4,44 μM BAP + 0,054 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; (G) 4,44 μM de BAP + 0,54 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; (H) 4,44 μM de BAP + 5,4 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 . Mostrando primórdios foliares originados a partir da superfície de protuberâncias. Barras = 3 mm.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Calos obtidos dos experimentos citados nos itens 2.3 e 2.4 deste capítulo foram fixados em Karnovsky modificado [glutaraldeído (2,5%) e

paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,2], por um período de, pelo menos, 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05M, por 4 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos e três vezes com 100%, por 10 minutos cada). Após a desidratação, foi realizada secagem em aparelho de ponto crítico CPD 030, por meio de CO₂ líquido e as amostras metalizadas com ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20kV (Alves, 2004).

2.7 Microscopia óptica

Calos obtidos dos experimentos citados nos itens 2.3 e 2.5 deste capítulo foram fixados em Karnovisky modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,2], por um período de, pelo menos, 24 horas, à temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05M, por 4 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos e três vezes com 100% por 10 minutos cada). Logo após, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona/resina Spurr 30%, por 8 horas, a 70%, por 12 horas e duas vezes a 100%, em intervalos de 24 horas. Os tecidos foram colocados em moldes de silicone em resina pura e colocados em estufa, a 70° C, por 48 horas, para a polimerização (Alves, 2004).

Em seguida, os blocos obtidos foram submetidos ao desbaste com equipamento para lixar. A resina excedente foi retirada utilizando-se lâminas de barbear e realizados cortes no micrótomo rotativo Spencer, na espessura média

de 3 μm . As seções semi-finas foram coletadas e colocadas em lâminas de vidro, coradas com azul de toluidina (1 g de azul de toluidina, 1 g de borato de sódio e 100 mL de água purificados em filtro Milipore 0,2 μm). Foram montadas lâminas permanentes do material obtido com bálsamo do Canadá. As seções semi-finas foram, então, visualizadas em microscópio óptico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do explante

Análises de seções paradérmicas de *Passiflora gibertii* N. E. Brown, coletadas no início do cultivo *in vitro* (dia 0), revelaram que a folha é hipoestomática (Figura 4A), com estômatos anomocíticos, com três células subsidiárias, sendo uma delas consideravelmente menor que as outras duas (Figura 5A). A epiderme é unisseriada e estabelece os limites do mesofilo dorsiventral. A última camada consiste de um parênquima paliádico uniseriado com células curtas não-justapostas e um parênquima esponjoso com duas ou três camadas de células arranjadas fracamente (Figura 4B).

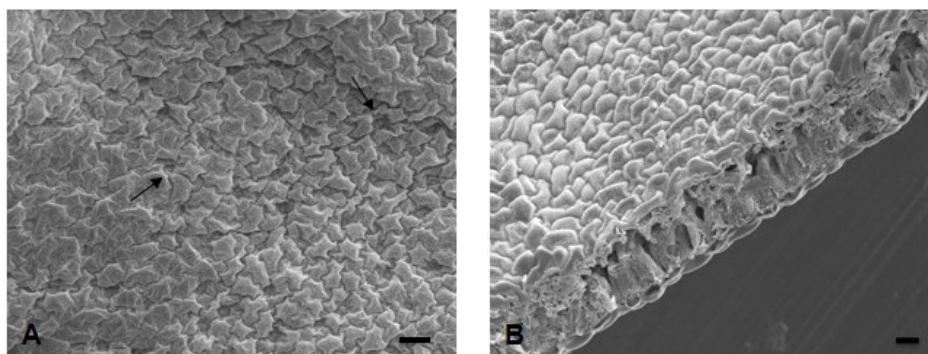


FIGURA 4. (A) Eletromicrografia da superfície abaxial (B) e da região transversal de explantes foliares de *Passiflora gibertii* de plântulas cultivadas *in vitro*. Observou-se a presença de estômatos abertos (setas). Barras = 20 μm .

Cortes transversais das folhas de maracujazeiro nativo de plantas em casa de vegetação mostraram a presença de feixes vasculares colaterais limitados por feixes parenquimáticos com ou sem extensão, ao longo do mesofilo. A nervura central apresenta o sistema vascular com quatro feixes colaterais arranjados na forma de um círculo e circundados pelo parênquima fundamental (Figura 5B). Esta caracterização confirma os dados apresentados por Abanto &

Müller (1972) e Appezzato-da-Glória et al. (1999) para a anatomia foliar de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

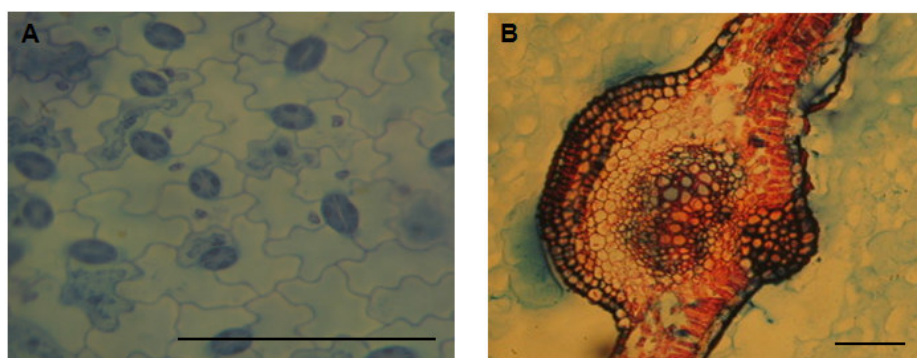


FIGURA 5. (A) Seção paradérmica da superfície abaxial (A) e seção transversal (B) de folhas de *Passiflora gibertii* de plântulas cultivadas em campo. Barras = 1 mm (A); 1 mm (B).

3.2 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de cinetina

3.2.1 Microscopia óptica

Os calos que se formaram quando foram empregadas diferentes concentrações de cinetina apresentaram aspecto organogênico, com coloração amarelo-esverdeada e textura não friável. Observou-se a presença de pontos esverdeados nos calos e pequenos primórdios foliares, o que indica formação de gemas e, posteriormente, a formação de brotos. Nos dias seguintes à inoculação dos explantes, observou-se um inchaço nos explantes de todos os tratamentos, seguido pela proliferação de células nas extremidades seccionadas dos discos foliares. Aos 30 dias de cultivo, foi possível observar primórdios foliares dispersos no calo.

Análises das seções transversais dos calos organogênicos de *Passiflora gibertii* evidenciam as mudanças nas estruturas internas dos discos foliares

cultivados em meio suplementado com 21,6 μM CIN e 28,86 μM de GA_3 (Figura 6). Podem-se observar regiões nos calos já diferenciadas com células arredondadas e organizadas, que se originaram a partir de células com potencialidade meristemática. Estas regiões constituem o início da formação de brotos a partir dos calos organogênicos. Também se observa um primórdio foliar em desenvolvimento com epiderme unisseriada de células diferenciadas e organizadas (Figura 6A).

Appezato-da-Glória et al. (1999), ao estudarem a organogênese indireta de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, observaram que os brotos adventícios se desenvolveram a partir de áreas meristemáticas, depois da segunda semana de cultivo *in vitro*, como resultado da atividade meiótica das células parênquimáticas.

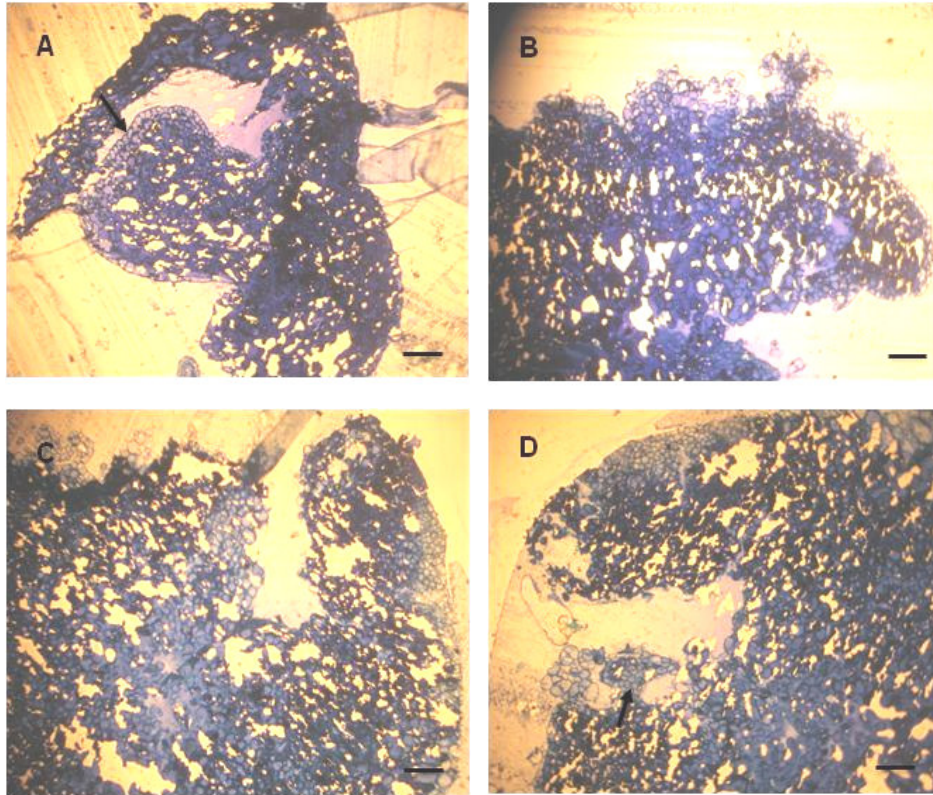


FIGURA 6. Seções longitudinais de brotos derivados de calos organogênicos, aos 30 dias de cultivo em meio suplementado com 21,6 μM CIN e 28,86 μM de GA_3 , mostrando primórdios foliares (setas) originados a partir da superfície de protuberâncias. Barras = 1 mm.

A formação de brotos em discos foliares em *Passiflora cincinnata* Mast., indiretamente por meio da formação de calos, foi relatada por Lombardi et al. (2007). Estes autores observaram que os brotos adventícios eram formados a partir da proliferação de células do parênquima clorofiliano. Esse fato evidencia que, em algumas regiões do parênquima clorofiliano, as divisões periclinais e anticlinais se intensificaram com o tempo de cultivo, formando um calo ao longo da superfície do explante. Meristemóides compostos por pequenas células com

um denso citoplasma e um núcleo conspícuo, foram formados na superfície das camadas de calos que, mais tarde, deram origem a brotos adventícios.

A maioria dos explantes apresentava calos nas extremidades dos discos foliares. Biasi et al. (2000) também observaram grande formação de calos nas extremidades de explantes foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Contudo, estes autores comentam que, apesar de estes tecidos de calos não parecerem organogênicos, com células grandes e largas, brotos adventícios sempre foram observados dispersos entre as células dos calos.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A proliferação de brotos ocorreu associada com a formação de calos. Inicialmente, observaram-se primórdios foliares de formato cônico, seguindo o desenvolvimento dos meristemas laterais das folhas. Observações em microscopia eletrônica de varredura dos calos organogênicos (Figura 7) evidenciaram que as folhas observadas a olho nu se tratavam de brotos e não apenas de primórdios foliares. Detalhes da folha de um broto, que possui aspecto normal, podem ser vistos na Figura 7A.

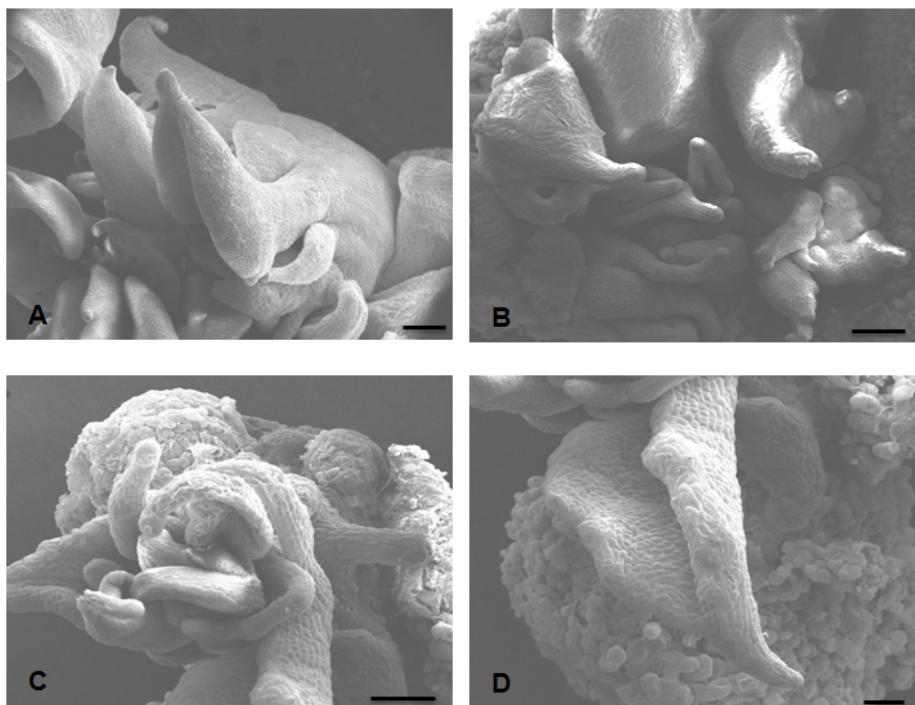


FIGURA 7. Eletromicrografia de calos organogênicos de *Passiflora gibertii* inoculados em meio MS suplementado com 21,6 µM CIN e 28,86 µM de GA₃, mostrando os brotos adventícios formados. (D) Detalhes da folha de um broto adventício. Barras = 200 µm (A); 200 µm (B); 200 µm (C); 100 µm (D).

Trevisan et al. (2006) comentam que muitas das estruturas reconhecidas como brotos adventícios são, de fato, primórdios foliares o que pode explicar porque o alongamento dos brotos é, muitas vezes, mencionado como problemático em *Passiflora*.

A via de regeneração indireta foi observada em explantes foliares e hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, por Fernando et al. (2007). Após 5 dias de cultivo, estes autores observaram divisões celulares no parênquima fundamental, próximo à superfície dos explantes seccionados que, mais tarde, deram origem a meristemóides. Alguns desses meristemóides deram

origem a primórdios foliares e muitos outros continuaram seu desenvolvimento, originando protuberâncias.

3.3 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares, em função de diferentes concentrações de BAP

3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Houve a formação e o desenvolvimento de brotos cultivados em meio suplementado com 4,44 μ M de BAP, em diferentes dias de cultivo (20, 40 e 60 dias) e com 8,88 M μ de BAP, aos 60 dias de cultivo. A formação de brotos ocorreu assincronicamente, com a presença de brotos em diferentes estágios de desenvolvimento nos dias observados. Em geral, observou-se o crescimento lateral das protuberâncias, chamadas de primórdios foliares. Ocorreu um crescimento apical, em que a folha sofreu um alongamento em seu eixo longitudinal (Figuras 8 e 9).

Appezato-da-glória et al. (1999) descreveram o processo de organogênese *in vitro* ao longo do tempo em *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*. Estes autores comentam, assim como foi observado no presente estudo, que os explantes cultivados no meio MS suplementado com 4,44 μ M de BAP apresentaram alterações na região da borda das folhas após a primeira semana de cultivo e verificaram a presença de vários brotos em diferentes fases de desenvolvimento, aos 30 dias de cultivo.

Esta falta de sincronia observada no presente estudo na espécie de maracujazeiro nativo pode ser evidenciada pela eletromicrografia de explantes foliares coletados em diferentes dias de cultivo (Figuras 8 e 9), no qual se observou a formação de novos brotos a cada data de coleta de amostras. A falta de sincronia na formação de brotos também foi notada por Arnold et al. (1988) e Saravitz et al. (1993).

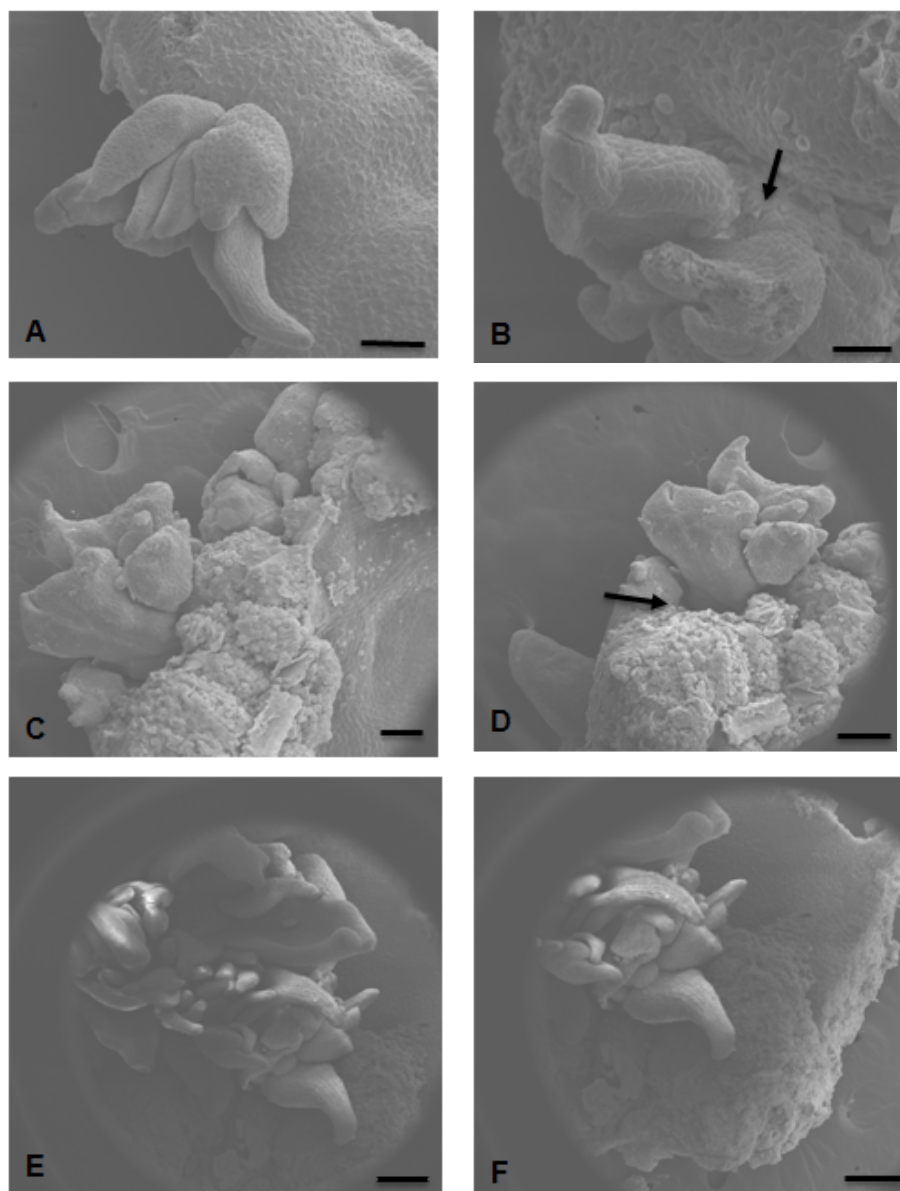


FIGURA 8. Eletromicrografia de discos foliares de *Passiflora gibertii* inoculados em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 20 (A-B), 40 (C-D) e 60 dias de cultivo *in vitro* (E-F). Brotos formados nas áreas periféricas das protuberâncias nos calos (setas). Barras = 200 μm (A); 100 μm (B); 200 μm (C); 300 μm (D); 300 μm (E); 300 μm (F).

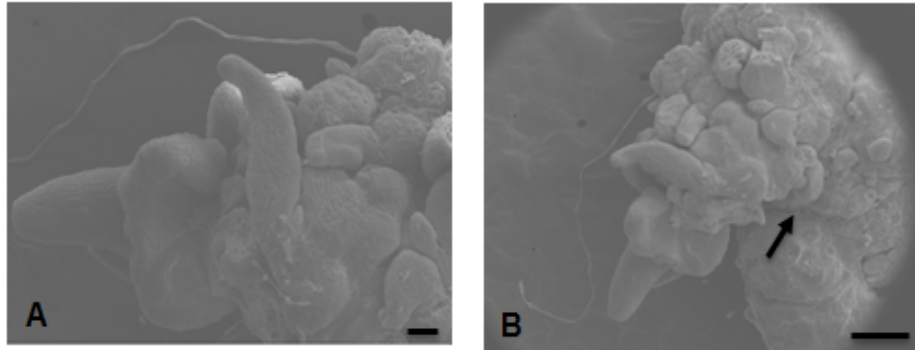


FIGURA 9. Eletromicrografia de discos foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inoculados em meio MS suplementado com 8,88 μM de BAP, aos 60 dias de cultivo *in vitro* (A-B). Brotos formados nas áreas periféricas das protuberâncias nos calos (setas). Barras = 100 μm (A); 300 μm (B).

Outra característica que pode ser observada nos calos organogênicos de *Passiflora gibertii*, por meio da microscopia eletrônica de varredura, é se os brotos observados a olho nu são realmente brotos ou apenas primórdios foliares. Fernando et al. (2007) e Trevisan et al. (2006) comentam que muitas das estruturas reconhecidas como brotos adventícios são, de fato, primórdios foliares e isso pode explicar por que o alongamento dos brotos é, muitas vezes, mencionado como problemático em *Passiflora* (Trevisan et al., 2006).

3.4 Indução de calos organogênicos a partir de explantes foliares em função do uso de BAP combinado com diferentes concentrações de ANA e nitrato de prata

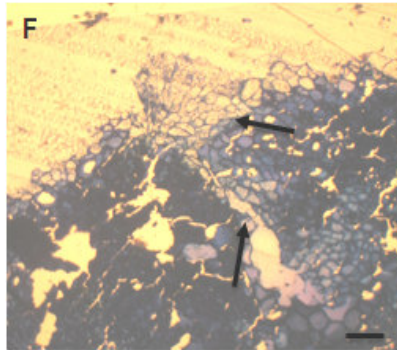
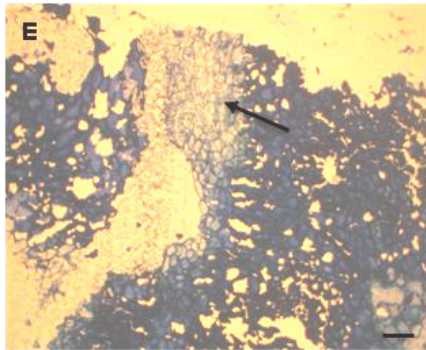
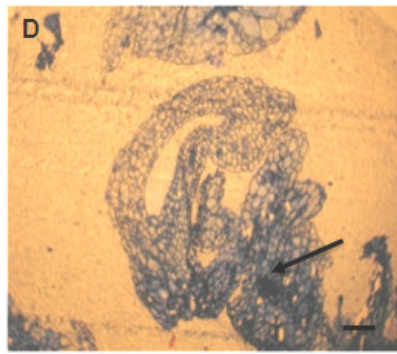
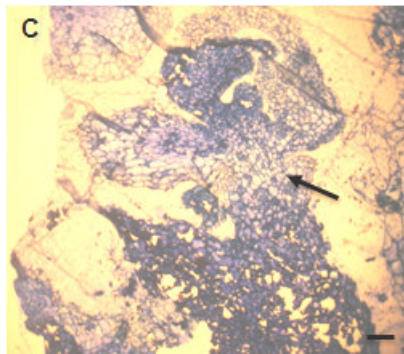
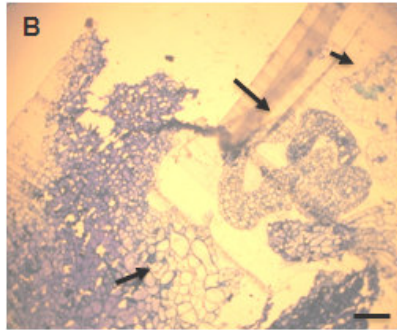
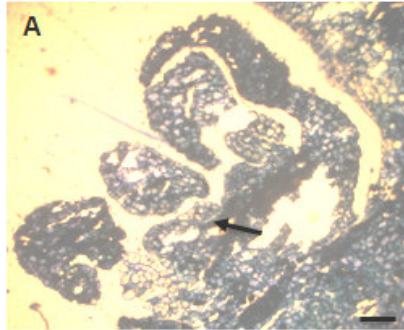
3.4.1 Microscopia óptica

A proliferação de calos foi observada na maioria dos explantes em todos os tratamentos, com menor intensidade quando não se utilizou AgNO_3 , combinado com BAP e diferentes concentrações de ANA. A formação de calos foi observada principalmente nas extremidades dos explantes foliares do

maracujazeiro nativo, com células maiores e arredondadas nas regiões das protuberâncias e dos brotos já em desenvolvimento (Figura 10). A proliferação de brotos ocorreu associada com a formação de calos; brotos em diferentes estágios de desenvolvimento foram observados nos explantes.

Nas protuberâncias formadas a partir dos calos organogênicos é possível se visualizar células já diferenciadas de formato arredondado. Nas Figuras 10 A, B, C e D, podem-se observar brotos já diferenciados, formados a partir de células com potencialidade meristemática, os quais já apresentam primórdios foliares com protoderme evidente.

Fernando et al. (2007) verificaram ambas as vias de regeneração, direta e indireta, em explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Estes autores verificaram a formação de estruturas denominadas meristemóides a partir de divisões de células parenquimáticas que, mais tarde, deram origem a primórdios foliares. Verificaram, ainda, que as protuberâncias formadas diretamente ou por meio da fase de calo, assim como verificado no presente estudo, possuíam uma epiderme contínua uniestratificada, a qual, junto com as camadas subepidérmicas, constituíam as células periféricas da protuberância.



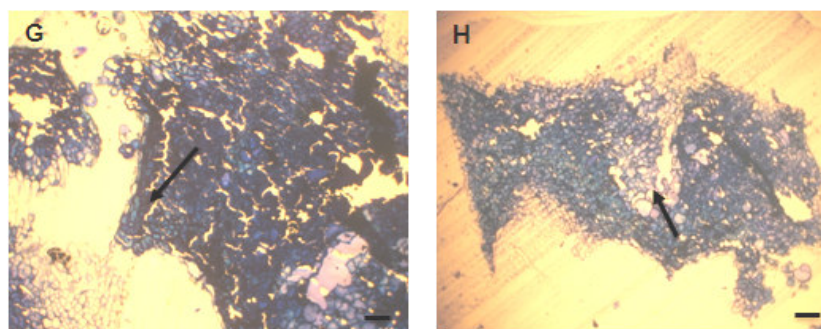


FIGURA 10. Cortes longitudinais de brotos adventícios de maracujazeiro nativo, formados a partir de calos organogênicos, aos 30 dias de cultivo em meio suplementado com (A) 4,44 μM BAP; (B) 4,44 μM BAP + 0,054 μM ANA; (C) 4,44 μM BAP + 0,54 μM ANA; (D) 4,44 μM BAP + 5,4 μM ANA; (E) 4,44 μM BAP + 23,54 μM AgNO_3 ; (F) 4,44 μM BAP + 0,054 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; (G) 4,44 μM de BAP + 0,54 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 ; (H) 4,44 μM de BAP + 5,4 μM ANA + 23,54 μM AgNO_3 . Mostrando primórdios foliares (setas) originados a partir da superfície de protuberâncias. Barras = 1 mm.

Appizzato-da-Glória et al. (1999) observaram que, em explantes foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, as primeiras modificações observadas nos explantes promovidas pelo tratamento com ANA em culturas mantidas no claro começaram no 14º dia. Ocorreram divisões em diversos planos no parênquima fundamental da nervura central e nas bordas das folhas. Contudo, a formação de meristemóides radiculares usualmente estimulados por uma auxina não foi observada durante o curso deste tipo de cultura. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, em que, apesar de ter sido empregada a auxina ANA, não se observou a formação de raízes via organogênese indireta.

4 CONCLUSÕES

A folha do maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* é hipoestomática, com estômatos isocíticos.

Análises de microscopia de varredura dos calos organogênicos são essenciais para se diferenciar brotos adventícios de primórdios foliares.

Um mesmo padrão morfológico de desenvolvimento de brotos foi observado por meio de análises anatômicas dos calos organogênicos induzidos em meio de cultivo suplementado com CIN, ANA e GA₃ e com BAP, ANA na presença e na ausência de AgNO₃.

Na região em que ocorreu a formação de brotos, houve a predominância de células rediferenciadas a partir do calo, com aspecto uniforme em estrutura organizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANTO, A. M.; MÜLLER, L. Algunos aspectos morfológicos del maracuyá, *Passiflora edulis*. **Turrialba**, San Jose, v. 22, n. 3, p. 268-274, jul./set. 1972.

ALVES, E. **Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2004. 51 p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, nov. 1999.

ARNOLD, S. von; ALSTERBORG, E.; WALLEES, B. Micromorphological studies of adventitious bud formation on *Picea abies* embryos treated with cytokinin. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 72, n. 2, p.248-256, Feb. 1988

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 661-665, out./dez. 2000.

BUKATSH, F. Benerkungren zur doppelfarbung astrablausafrina. **Microkosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 255-260, 1972.

FARIA, G. M.; COSTA, M. A. P. de C.; LEDO, C. A. da S.; JUNGHANS, T. G.; ZOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p.535-543, 2007.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 37-44, Oct. 2007.

FIGUEIREDO, M. A. de; PAIVA, R. SOUZA, A. C. de; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. da S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 239-247, Mar. 2007.
- MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- SARAVITZ, C. H.; BLAZICH, F. A.; AMERSON, H. V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of Fraser fir. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, p.163-167, 1993.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Iowa: Iowa State College, 1951. 350 p.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 346-350, jul./ago. 2005.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J.; MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M.; REZENDE, J. A. M. Resistance to passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 2, p. 1026-1030, Feb. 2006.