

**OBTENÇÃO, ANÁLISES MORFOLÓGICAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS DE CALOS DE
Passiflora spp.**

MILENE ALVES DE FIGUEIREDO

2007

MILENE ALVES DE FIGUEIREDO

**OBTENÇÃO, ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ULTRA-
ESTRUTURAIS DE CALOS DE *Passiflora* spp.**

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

2007

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

Figueiredo, Milene Alves

Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de
Passiflora spp. / Milene Alves de Figueiredo. -- Lavras : UFLA, 2007.
113 p. : il.

Orientador: Renato Paiva

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Maracujazeiro nativo. 2. Germinação *in vitro*. 3. Calogênese. 4.
Análises morfológicas e ultra-estruturais. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-634.425

MILENE ALVES DE FIGUEIREDO

**OBTENÇÃO, ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ULTRA-
ESTRUTURAIS DE CALOS DE *Passiflora* spp.**

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 27 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dra. Raírys Cravo Nogueira

UFLA

Prof. Dr. Breno Regis Santos

UNIPAC

Prof. Dr. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

*A Deus,
pela benção da vida e presença constante ao meu lado,*

OFEREÇO

*Aos meus amados pais, Heider e Marlene,
Aos meus queridos irmãos, Hedeilson, Madeleine e Marislaine.*

*À vovó Nida,
Ao meu amor, Flavinho,
pelo amor incondicional, apoio e incentivo*

DEDICO

*A minha família,
À vó Maria, tios, primos e Jack
A Darlene e Carlos Alberto,
pela torcida*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, pelo aprendizado, amizade e incentivo durante o curso.

Aos membros da banca examinadora: prof. Dr. Eduardo Alves, Dra. Raírys Cravo Nogueira, Prof. Dr. Breno Regis Santos e Dr. Marcelo Murad Magalhães (suplente).

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

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

A todos os professores da UFLA, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Raírys, Vanessa, Fernanda, Tina, Marcelo Padovani, Cristiano, Patrícia, Rodrigo, Gabriela, Aline, Marcelo, Luciano, Eduardo, Letícia, Diogo, Jessé, Dayane, Cleilton, Lenaldo, Sidi e Fran, pela colaboração e amizade.

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

À Vó Melinha, tia Beth e tia Lúcia, pelo amor e dedicação.

A minhas amigas Érica, Beth, Priscila, Simone, Flávia, Keize, Juliana, Cris, Carol e Letícia, pela convivência, apoio e grande amizade.

À grande amiga e irmã de alma, Fúlvia, pela amizade incondicional, pelo carinho fraterno e por toda a ajuda.

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

BIOGRAFIA

Milene Alves de Figueiredo, filha de Marlene Alves de Paula Figueiredo e Heider Francisco Barros de Figueiredo, nasceu em Varginha, MG, no dia 17 de julho de 1983. cursou o ensino fundamental e médio no Instituto Presbiteriano Gammom, concluindo-o em 2000. Em 2001, foi aprovada no vestibular para o curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). De 2002 a 2005, foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA. Em agosto de 2005, graduou-se e iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal na UFLA e, dezoito meses depois, encerra esta etapa profissional com a presente dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Aspectos gerais da cultura.....	3
2.2 Importância da espécie <i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown e outras espécies silvestres de maracujazeiro.....	4
2.3 Germinação <i>in vitro</i> de <i>Passiflora</i> spp.....	7
2.4 Micropropagação e análises morfológicas e ultra-estruturais de <i>Passiflora</i> spp.....	9
3 Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2 - Aspectos da germinação <i>in vitro</i> de sementes de maracujazeiro <i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	19
1 Introdução.....	20
2 Material e métodos.....	22
3 Resultados e discussão.....	24
4 Conclusões.....	28
5 Referências bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 3 – Indução de calos em <i>Passiflora</i> spp.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	35
1 Introdução.....	36
2 Material e métodos.....	39
2.1 Indução de calos organogênicos em diferentes explantes.....	39
2.1.1 Material vegetal.....	39
2.1.2 Calogênese.....	39
2.1.3 Organogênese.....	40
2.2 Indução de calos organogênicos a partir de segmentos foliares de <i>Passiflora gibertii</i>	41
2.2.1 Material vegetal.....	41
2.2.2 Calogênese.....	41
2.2.3 Organogênese.....	42

2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares cotiledonares de <i>Passiflora gibertii</i>	43
2.3.1 Material vegetal.....	43
2.3.2 Calogênese.....	43
3 Resultados e discussão.....	44
3.1 Indução de calos organogênicos em diferentes explantes.....	44
3.2 Indução de calos organogênicos a partir de segmentos foliares de <i>Passiflora gibertii</i>	49
3.3 Indução de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares cotiledonares de <i>Passiflora gibertii</i>	53
4 Conclusões.....	57
5 Referências bibliográficas.....	58
CAPÍTULO 4 – Análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de maracujazeiro <i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown.....	63
Resumo.....	63
Abstract.....	65
1 Introdução.....	67
2 Material e métodos.....	68
2.1 Material vegetal e procedimentos laboratoriais do cultivo <i>in vitro</i>	68
2.2 Organogênese.....	69
2.3 Embriogênese somática.....	70
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	71
2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	72
3 Resultados e discussão.....	73
3.1 Organogênese.....	73
3.2 Embriogênese somática.....	81
4 Conclusões.....	106
5 Referências bibliográficas.....	107
ANEXOS.....	111

RESUMO GERAL

FIGUEIREDO, Milene Alves. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O Brasil ocupa posição de destaque na cultura do maracujazeiro, sendo o maior produtor mundial de maracujá. Nos últimos anos, o aumento da demanda provocou a expansão da área plantada e, com isso, houve o surgimento e a expansão de um grande número de doenças. Algumas espécies não cultivadas, como *Passiflora gibertii* N. E. Brown e *Passiflora edulis edulis*, têm importantes contribuições para o melhoramento genético, por apresentarem resistência a doenças e pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas. O objetivo deste trabalho é analisar aspectos da germinação e da regeneração *in vitro*, bem como caracterizar, nos níveis morfológico e ultra-estrutural, calos de *Passiflora* spp. Os resultados permitem afirmar que a espécie nativa *P. gibertii* possui dormência extra-embriônica mecânica, que é superada com a escarificação da ponta da semente com bisturi. As sementes frescas obtêm maior porcentagem de germinação que as secas, porém, com maior porcentagem de germinação para sementes secas quando se utiliza escarificação da ponta da semente. A espécie *P. gibertii* responde melhor à formação de calos que *P. edulis edulis* nativo; a utilização de 8,88 µM de BAP promove maior porcentagem de calos a partir de segmentos foliares; segmentos radiculares de *P. gibertii* e *P. edulis edulis* nativo não formam calos e não há diferença entre segmentos nodal e foliar na formação de calos de espécies de *Passiflora* nativo; segmentos nodal e foliar de *P. gibertii*, após transferidos para meio MSM contendo GA₃, formam gemas; calos oriundos de condições de escuro são mais responsivos à formação de gemas em *P. gibertii*; o meio de indução mais indicado para organogênese é o meio MS, contendo metade da concentração de seus sais; a adição de água de coco ao meio de cultura é essencial, tanto para a indução de calos como para a formação de gemas em *P. gibertii*. A adição de picloram e cinetina ao meio de cultura promove maior formação de calos em explantes foliares cotiledonares de *P. gibertii* que 2,4-D e cinetina. Diferentes colorações de calos, oriundos de explantes foliares cotiledonares, são observadas nos tratamentos utilizando-se picloram e cinetina. Explantes foliares de *P. gibertii* mantidos em meio de cultura MS no escuro

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador).

acrescido de BAP (8,88 μ M) e água de coco (5%) por 30 dias, induzem a formação de calos, que, posteriormente, transferidos para meio MS, na presença de luz e contendo BAP (2,22 μ M) tornam-se organogênicos, cujos parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, núcleo com nucléolo proeminente, presença de grãos de amido e citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático. O regulador 2,4-D proporciona a obtenção de calos com características embriogênicas (células com formato isodiamétrico, pequenas e com pequeno espaço intercelular, sistema celular organizado e predominância de mitocôndrias de formato arredondado), enquanto resultados negativos (predominância de células com formato alongado, células maiores e com espaços intercelulares, sistema celular desorganizado e predominância de mitocôndrias de formato alongado) são observados para picloram. Calos translúcidos e amarelo-claros apresentam características não-morfogênicas, como células de diferentes formatos, sistema celular desorganizado, células grandes e ausência ou pouco conteúdo de amido. Calos de coloração amarelo-escuro e branco-marrom apresentam características embriogênicas e os parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são: predominância de células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, células pequenas, citoplasma denso e rico em mitocôndria e retículo endoplasmático.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Milene Alves. **Production, morphologic and ultra-structural analyses of *Passiflora* spp. callus.** 2007. 113p. Dissertation (Master's degree in Agronomy/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Brazil occupies a position of prominence in the passion fruit plant culture, being the largest world producer of passion fruit. In the last years, the increasing demand resulted in a expansion of the planted area resulting in the expansion and appearance of many diseases. Some species not cultivated, as *Passiflora gibertii* N. E. Brown and *Passiflora edulis edulis*, present important contributions for plant breeding, for having pests and diseases resistance, longevity, larger adaptation to adverse climatic conditions, enlarged flowering period, larger concentration of interesting chemical components for the pharmaceutical industry and other potentialities, almost unexplored. The objective of this work was to analyze *in vitro* regeneration and germination aspects, as well as to characterize, at morphologic and ultra-structural levels, callus of *Passiflora* spp. The results allow to affirm that the native species *P. gibertii* has mechanical extra-embryonic dormancy, that is overcome with seed tip scarification using a scalpel. Fresh seeds present larger germination percentage than the dry seeds, however, larger germination percentage for dry seeds are obtained using tip scarification. The *P. gibertii* species respond better to the callus formation than native *P. edulis edulis*; the use of 8,88 μM BAP promotes larger callus percentage from leaf segments; root segments of *P. gibertii* and native *P. edulis edulis* do not form callus and there is no difference between leaf and nodal segments in the formation of native *Passiflora* species callus; *P. gibertii* leaf and nodal segments, after transferred to MSM medium containing GA_3 , form bud; callus from dark conditions are more responsive to MS medium contain half of its salt concentration is the most indicated for organogenesis; the addition of coconut water to the culture medium is essential for callus induction and bud formation in *P. gibertii*. The picloram and kinetin addition to the culture medium promotes larger callus formation in cotyledonary leaf explants of *P. gibertii* than 2,4-D and kinetin. Different callus colors, from the cotyledonary leaf explants, are observed in treatments using picloram and kinetin. *P. gibertii* leaf explants inoculated in MS culture medium and maintained in the dark in the presence of BAP (8,88 μM) and coconut water (5%) for 30 days, induce callus formation, which, later transferred to MS medium, in the presence of light and BAP (2,22 μM) turned organogenic, whose

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - UFLA (Advisor).

ultra-structural and morphologic parameters associated were of isodiametric cells, presenting organized cellular system, nucleus with prominent nucleolar, presence of starch grains and dense cytoplasm rich in endoplasmic reticulum. The growth regulator 2,4-D provides the obtaintion of callus with embryogenic characteristics (cells with isodiametric format, small and with small intercellular space, organized cellular system and predominance of round format mitochondria), while negative results (predominance of prolonged format cells, larger cells with intercellular spaces, disorganized cellular system and predominance of prolonged format mitochondrias) are observed when picloram is used. Translucent and yellow-clear callus present no-morfogenic characteristics, like cells of different formats, disorganized cellular system, larger cells and absence or reduced starch content. Callus of yellow-darkness and white-brown coloration presented embryogenic characteristics with the following morphologic and ultra-structural parameters: predominance of isodiametric format cells, organized cellular system, small cells, dense cytoplasm rich in mitochondria and endoplasmic reticulum.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do maracujazeiro no Brasil ocupa uma posição de destaque, pois, atualmente, o país é o maior produtor mundial de maracujá com uma produção de, aproximadamente, 448.000 toneladas. O aumento da demanda do mercado internacional e nacional por sucos e pela fruta *in natura* fez com que houvesse expansão da área plantada; entretanto, houve o surgimento e o agravamento de um grande número de doenças.

Algumas espécies não cultivadas de *Passiflora* spp. têm expressivas contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentarem resistência a doenças e pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas.

A desuniformidade na germinação das sementes, a falta de conhecimento do período de viabilidade destas e o longo período de dormência são fatores que impedem a obtenção de material para propagação em quantidade suficiente.

Por sua vez, a matéria-prima, para auxiliar os programas de melhoramento é a variabilidade genética disponível em bancos de germoplasma que, neste caso, é bastante pequena, tanto em âmbito internacional quanto no nacional, apesar das fontes de recursos genéticos disponíveis na natureza serem muito amplas.

A micropropagação tem sido utilizada com frequência em inúmeras espécies vegetais, por manter a identidade genética dos indivíduos e possibilitar

a obtenção de grande número de plantas sadias e de alta qualidade fitossanitária em pequeno espaço físico e em curto tempo, em qualquer época do ano.

As duas vias de regeneração *in vitro*, organogênese e embriogênese somática podem ocorrer de forma direta (sem formação de calos) ou indireta (com formação de calos) e serem avaliadas e caracterizadas citologicamente.

O cultivo *in vitro* de espécies nativas de *Passiflora* spp. é importante, tanto para a multiplicação de clones com características superiores como para a aplicação das técnicas de transformação genética e hibridação somática. Em programas de melhoramento, esta é essencial para a propagação e a manutenção da cultura.

Objetivou-se, com este trabalho, analisar aspectos da germinação e da regeneração *in vitro*, bem como caracterizar, em níveis morfológico e ultra-estrutural, calos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura

O maracujazeiro pertence a, aproximadamente, 630 diferentes espécies de *Passiflora* L., gênero da família Passifloraceae, que compreende 18 gêneros com distribuição, principalmente, nos trópicos da América, Ásia e África (Meletti, 2000; Ruggiero et al., 1996).

O Brasil possui uma área plantada de 36.576 ha, ressaltando-se os estados da Bahia (8.895 ha), do Pará (4.187 ha), de Sergipe (4.161 ha), do Espírito Santo (3.243 ha), de Minas Gerais (3.147 ha) e de São Paulo (2.641 ha). Em 2004, o país produziu 491.619 toneladas, com rendimento médio de 13.441 kg ha⁻¹. O Nordeste brasileiro contribuiu com 17.458 ha da área plantada no Brasil, em 2004. (IBGE, 2004). De acordo com estimativas da ITI Tropicals (2006), a produção de maracujá é de 640.000 toneladas e o Brasil, como produtor mundial, responde por, aproximadamente, 70% desse total. O Equador aparece em segundo lugar e a Colômbia em terceiro, com, respectivamente, 85.000 e 30.000 toneladas. Apesar dessa posição, a produtividade nacional é muito variada e, na maioria das vezes, baixa em relação ao potencial produtivo da cultura.

A produção brasileira de maracujá adquiriu expressão econômica há pouco mais de 25 anos, inicialmente pelo incentivo da agroindústria e, em seguida, pela crescente demanda no mercado de frutas frescas. A expansão dos pomares foi significativa e, atualmente, o maracujá vem sendo cultivado em quase todo o território nacional, de onde resulta a maior produção mundial. No entanto, 95% dos pomares são cultivados com uma única espécie, o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) (Meletti, 2005).

A matéria-prima para auxiliar os programas de melhoramento é a variabilidade genética disponível em bancos de germoplasma que, neste caso, é bastante pequena, apesar das fontes de recursos genéticos disponíveis na natureza serem muito amplas. Poucas espécies têm sido cultivadas e observa-se um número significativo de formas selvagens, nativas, compatíveis entre si, propagadas por sementes de polinização aberta (Meletti, 2005).

O maracujazeiro é originário da América Tropical, com mais de 150 espécies nativas do Brasil. Entretanto, entre tantas espécies diferentes, nem todas produzem frutos comestíveis e aproveitáveis e apenas um pequeno número consegue ocupar espaços nos grandes mercados frutíferos nacionais e internacionais. Vários maracujás nativos do Brasil são cultivados em outros países tropicais, tais como o Hawaí, Venezuela, África do Sul e Austrália, onde tem considerável importância econômica (Alves & Melo, 2003).

Não é por acaso que o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, pois, aliados a outros importantes fatores, existem, no país, as maiores e melhores coleções de germoplasma de *Passiflora* do mundo, o que dá sustentabilidade a essa pujante agroindústria brasileira. Embora o Brasil tenha essa posição privilegiada, quando comparado aos demais países, em termos de recursos genéticos, verifica-se que há, ainda, um longo e urgente caminho a percorrer, notadamente em relação ao resgate e à conservação de germoplasma.

2.2 Importância da espécie *Passiflora gibertii* N. E. Brown e outras espécies silvestres de maracujazeiro

Considerando a grande variabilidade do maracujazeiro, programas de melhoramento genético têm sido conduzidos visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies selvagens (Barbosa, 1998).

A ampla diversidade genética verificada entre as diferentes espécies do gênero *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, evidencia o promissor uso em programas de melhoramento genético e também como porta-enxerto para variedades comerciais (Paula et al., 2005; Roncatto et al., 2004).

Oliveira et al. (1994) e Oliveira & Ruggiero (1998), analisando o comportamento de várias espécies de maracujazeiro em relação à morte prematura, verificaram que *Passiflora nitida*, *P. laurifolia* e alguns acessos de *P. suberosa*, *P. alata*, *P. caerulea*, *P. gibertii* e *P. setacea* mostraram-se resistentes.

Baldin & Lara (2002) avaliaram a atratividade e a preferência alimentar de adultos de *Epicauta atomaria* por folhas de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), sob condições de laboratório e concluíram que a espécie *P. setacea* é a mais suscetível ao ataque da praga, enquanto *P. nitida* e *P. gibertii* são resistentes, expressando não preferência para a alimentação. Lara (1991) e Rossetto et al. (1981) ressaltam que o controle de insetos pelo uso de materiais resistentes é o método ideal, principalmente em virtude da preservação ambiental e da sensível redução nos custos de produção.

A baixa produtividade do maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg), no Brasil, deve-se, em grande parte, a problemas fitossanitários. Dentre eles as doenças provocadas por patógenos do solo são as mais importantes, em termos de expressão econômica (Meletti & Bruckner, 2001; Menezes et al., 1994). Vários autores (Meletti & Bruckner, 2001; Menezes et al., 1994; Pace, 1984; Roncatto et al., 2004) relatam a necessidade de se usar porta-enxertos resistentes para controlar a fusariose e a morte prematura do maracujazeiro. Oliveira & Ruggiero (1998) sugerem que sejam realizadas mais observações referentes ao comportamento como porta-enxerto das espécies *P. nitida*, *P. gibertii*, *P. caerulea*, *P. macrocarpa*, *P. setacea*, *P. laurifolia*, *P. alata*, *P. incarnata*, *P. cincinnata*, *P. serrato digitata* e *P. coccinea*, visto serem espécies vigorosas e apresentarem ampla adaptação, além

de possuírem características de resistência a doenças, o que as torna promissoras para o uso no melhoramento genético.

Menezes et al. (1994) e Oliveira et al. (1984) relatam a boa compatibilidade de *Passiflora gibertii* como porta-enxerto, com o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). Oliveira et al. (1984) 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.

Espécies silvestres do gênero *Passiflora* (*P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifila*, *P. mucronata*, *P. gibertii*, *P. amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. caerulea*, entre outras) têm apresentado, com base em estudos preliminares, variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro (Cunha et al., 2002).

Entre as várias espécies de passifloras silvestres do Brasil, algumas têm características interessantes, que podem ser introduzidas no maracujazeiro comercial. Vários autores (Fischer, 2003; Meletti & Bruckner, 2001; Menezes et al., 1994; Oliveira et al., 1994; Oliveira et al., 1986) relataram a resistência de *P. nitida*, *P. caerulea*, *P. laurifolia*, alguns acessos de *P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii* e *P. setacea* à morte prematura e a outras doenças causadas por patógenos do solo.

Meletti e Bruckner (2001) relatam a necessidade de se usar porta-enxertos resistentes para controlar fungos do solo e nematóides do maracujazeiro.

Sharma et al. (2005), em estudos de resistência em *Passiflora* spp. a nematóides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), constataram que, das 11 espécies avaliadas, cinco, *P. edulis* f. *flavicarpa* nativa, *P. caerulea*, *P. edulis*, *P. giberti* e *P. quadrangulares*, foram resistentes a *Meloidogyne incógnita*, enquanto *P. capsularis*, *P. ligularis*, *P. nítida* e *P. tricuspis* foram suscetíveis e duas

espécies, *P. morofolia* e *P. mucronata*, foram altamente suscetíveis. Em relação a *Meloidogyne javanica*, das 14 espécies avaliadas, 11 (*P. actinia*, *P. edulis*, *P. giberti*, *P. haematostigma*, *P. ligularis*, *P. edulis* f. *flavicarpa* nativa, *P. nitida*, *P. tenuifilla*, *P. tricuspis*, *P. quadrangulares* e *P. suberosa*) foram resistentes e *P. capsularis*, imune enquanto *P. caerulea* e *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa* (híbrido) foram suscetíveis.

Oliveira et al. (1984), em estudos com *P. edulis* enxertado em *P. gibertii*, constataram, em área com histórico de ocorrência de morte prematura de plantas, que, dos 30 enxertos, apenas dois morreram, enquanto das 50 mudas de pé-franco, somente duas sobreviveram.

Roncatto et al. (2004) estudaram o comportamento de Passifloráceas (*P. edulis* Sims, *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. nitida* H.B.K., *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. laurifolia*, *P. morifolia*, *P. foetida* e *P. capsularis*) quanto à morte prematura de plantas, cultivadas em local com histórico da doença. A morte prematura das plantas ocorreu entre dois meses e dois anos da cultura no campo, tendo *P. gibertii* e *P. nitida* se mostrado resistentes à doença, independentemente do local de origem. Entre os demais “acessos”, não se encontraram fontes promissoras de resistência.

São José et al. (2000), citados por Roncatto et al. (2004), testaram as espécies *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. alata* Dryander, *P. macrocarpa*, *P. giberti*, *P. laurifolia* e *P. foetida*, em local contaminado com fusariose e observaram que *P. alata* e *P. gibertii* apresentaram melhor comportamento em relação à morte provocada por fusariose.

2.3 Germinação *in vitro* de *Passiflora* spp.

É de fundamental importância o conhecimento sobre os aspectos da germinação de sementes das diversas espécies de *Passiflora* para a propagação e a manutenção de bancos de germoplasma, visando evitar a erosão genética

(Passos et al., 2004). O tempo médio de germinação e a sua uniformidade poderão proporcionar produção de mudas em escala comercial, de maneira mais eficiente (Alexandre et al., 2004).

Vários aspectos da germinação de sementes de maracujazeiro são conhecidos, porém, a afirmativa de que o início e o término de germinação das sementes de Passifloráceas ocorrem de forma irregular, é unânime. Este período pode ser de dez dias a três meses, o que dificulta a formação das mudas, por não serem uniformes (Akamine et al., 1956; Kuhne, 1968; Luna, 1984 citados por Alexandre et al., 2004).

Segundo Santos et al. (2003), a propagação de espécies nativas é limitada pela ocorrência de dormência nas sementes, retardando a sua germinação. A dormência pode ser definida como o fenômeno pelo qual sementes de uma determinada espécie, mesmo sendo viáveis e tendo todas as condições ambientais para tanto, deixam de germinar. O estado de dormência não se confunde com o de quiescência, que é um estado de repouso em que, estando viável a semente, ele é facilmente superável, com o fornecimento das condições ambientais necessárias (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Problemas de germinação são muito comuns no gênero *Passiflora*, até mesmo no maracujá-amarelo, a espécie mais cultivada (Meletti et al., 2002). Segundo Pereira & Dias (2000), um dos problemas enfrentados pelos produtores de maracujá está relacionado com sua propagação, realizada por meio de sementes que apresentam baixa e desuniforme germinação, dificultando, assim, a formação de mudas de qualidade. No caso de espécies silvestres de *Passiflora* spp., tolerantes a moléstias e com importante potencial para porta-enxertos, o período de dormência é muito mais longo do que em outras passifloráceas (Meletti et al., 2002; Manica et al., 2005).

Segundo Villiers (1975), citado por Santos et al. (2003), a dormência devido à impermeabilidade ou à resistência mecânica do tegumento pode ser

superada naturalmente por danos mecânicos causados por insetos, decomposição microbiana do tegumento ou, ainda, pelo fogo. Artificialmente, as técnicas mais comumente utilizadas para a superação da dureza das sementes são escarificação mecânica por meio de ruptura ou abrasão do tegumento, choque térmico e escarificação química com ácidos concentrados (Cohn, 1996; Ferreira et al., 1992 citado por Santos et al., 2003).

A germinação pode ser promovida pela aplicação de reguladores de crescimento, tais como auxinas, citocininas, giberelinas (GAs), etileno e outros. Desses reguladores, as giberelinas estão diretamente relacionadas à germinação de muitas sementes, uma vez que sua aplicação exógena promove a expressão dos genes que controlam a síntese das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares do endosperma, induzindo o crescimento do embrião e estimulando o processo germinativo. Além disso, as giberelinas contrabalançam a inibição imposta pelo ácido abscísico, provocando um aumento endógeno de GAs, que torna evidente sua participação na superação da dormência das sementes (Cardoso, 2004). O tipo de GA mais utilizado *in vitro* é o ácido giberélico (GA₃).

2.4 Micropropagação e análises morfológicas e ultra-estruturais de *Passiflora* spp.

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, segundo o qual, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Pasqual, 2000). Dessa forma, é uma importante ferramenta, não só na genética e no melhoramento de plantas, como também pode auxiliar em inúmeras áreas da agricultura (Ramalho et al., 1997).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada a variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto período de tempo e em grande escala, destacando-se, como alternativa importante, principalmente, para as culturas de ciclo longo (Andrade, 1998).

O estabelecimento *in vitro* de maracujazeiro é essencial quando se deseja fazer a manutenção de germoplasma de *Passiflora*, utilizando-se procedimentos biotecnológicos. Para tanto, devem estar disponíveis, na literatura, protocolos de assepsia para os explantes obtidos de sementes, folhas, gemas, segmentos internodais, etc., protocolos para germinação de sementes das diversas espécies, bem como protocolos de organogênese adventícia de plantas a partir de cotilédones, hipocótilos, folhas e de segmentos entrenodais e desenvolvimento de plantas a partir de ápices meristemáticos e gemas.

A cultura de tecidos em *Passiflora* spp. pode contribuir para a obtenção de plantas com características agronômicas desejáveis, utilizando-se as técnicas de micropropagação, hibridação somática ou transformação genética, associadas a programas de melhoramento genético. O processo de transformação genética permite a introdução de gene(s) exógeno(s) no genoma de interesse. Por meio deste processo, podem-se isolar genes de resistência a determinada doença e introduzi-los na espécie de interesse, obtendo-se plantas resistentes. A aplicação de técnicas de transformação genética depende da obtenção de sistemas eficientes de regeneração de plantas (Monteiro-Hara, 2000). A hibridação somática, via fusão de protoplastos, consiste em uma alternativa de transferência de genes de resistência a doenças, presentes em espécies selvagens, para a espécie cultivada (Barbosa, 1998).

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998). É utilizada comercialmente, permitindo que uma planta com características desejáveis possa ser multiplicada indefinidamente (Pasqual, 2000).

Inúmeros fatores podem estar, direta ou indiretamente, envolvidos com o sucesso da morfogênese *in vitro*, podendo-se citar como exemplos: 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. Arruda et al. (2005), por exemplo, afirmam que a temperatura de cultivo das plantas fornecedoras de explantes influencia na indução do processo organogênico, ocasionando variações na eficiência de regeneração e alterações significativas nos teores de nutrientes, proteínas e carboidratos. Material vegetal de *P. edulis* introduzido *in vitro* em épocas mais frias do ano resulta na formação intensa de calo, em especial nas bordas dos explantes, enquanto, em épocas mais quentes do ano, observa-se a formação de gemas, sobretudo diretamente a partir do explante, mas, em menor frequência, também a partir de calo.

Já existem muitos estudos publicados sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora*, mas lacunas permanecem. Diversos fatores contribuem para isso e um dos principais é a variação da resposta entre genótipos, que tem sido extensivamente descrita na literatura. As variações são mais evidentes quando são feitos experimentos com espécies pouco domesticadas de maracujá, em que a variabilidade genética existente é muito grande. As respostas diferentes se acentuam por conta dos vários explantes utilizados, das diversas condições ambientais de incubação, como luz, temperatura e fotoperíodo, tipos de frascos de cultura, meios de cultura e suas variações, somente para citar alguns.

A despeito da importância dos estudos morfológicos e ultra-estruturais, pouco tem sido publicado em *Passiflora*. Para verificar e confirmar a via de regeneração *in vitro*, diferenciando-se organogênese de embriogênese somática, devem ser realizados estudos histológicos. Depois de caracterizada a via de regeneração, podem-se estabelecer melhores condições de cultivo, para o

estabelecimento de protocolos eficientes para a indução e a obtenção de plantas. Além disso, permitem também caracterizar as alterações celulares e a atividade de organelas, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos (Monteiro-Hara, 2000).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S.; WAGNER JUNIOR, A.; NEGREIROS, J. R. S.; PARIZZOTTO, A.; BRUCKNER, C. H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1239-1245, dez. 2004.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. **Cultura do Maracujazeiro**. Núcleo de Estudo em Fruticultura no cerrado. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias. 2003. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/maracuja2.html>. Acesso em 06 de janeiro de 2007.

ANDRADE, L. M. da C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1998. 86 p.

ARRUDA, S. C. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; RODRIGUEZ, A. P. M. Efeito da temperatura na organogênese adventícia em maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados**, 4, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 187-191. 2005.

BALDIN, E. L. L.; LARA, F. M. Atratividade e preferência alimentar de adultos de *Epicauta atomaria* (Germ., 1821) (Col. : Meloidae) em maracujazeiros (*Passiflora* spp.) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 68-71, abr. 2002.

BARBOSA, L. V. **Citologia de híbridos somáticos de *Passiflora* spp. obtidos por fusão de protoplastos.** Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998. 127p.

CARDOSO, V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal.** 2004. 452p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 104 p. 2002. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, n. 15).

FERREIRA, A. G.; JOÃO, K. H. L.; HEUSER, E. D. Efeitos de escarificação sobre a germinação e do pH no crescimento de *Acacia bonariensis* Gill e *Mimosa bimucronata* (D. C.) O. K. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** Londrina, v. 4, n. 1, p. 63-65, jul. 1992.

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

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

IBGE, Pesquisa Agrícola Municipal, Rio de Janeiro, v. 31, 2004. 133p.

ITI **Tropicals.** Disponível em: <http://www.passionfruitjuice.com>. Acesso em 29 de dezembro de 2006.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos.** São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I. M.; AGUIAR, J. L. P.; AZEVEDO, J. A.; VASCONCELLOS, M. A. S.;

JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá-doce**: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. 198 p.

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

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônomo**, Campinas, v. 54, n. 1, p. 30-33, 2002.

MELETTI, L. M. M. Maracujá-roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 194-348, ago. 2005.

MELETTI, L. M. M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239 p.

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, 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-HARA, A. C. B. A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2000. 82 p.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; CENTURION, M. A. P. C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R.; MAURO, A. O.; SACRAMENTO, C. K. Avaliação de *Passifloraceas* quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13. Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA: SBF, 1994. v. 3, p. 827. (Resumo 347).

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

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K.; BAPTISTA, M. Comportamento de *Passiflora edulis* enxertada sobre *Passiflora giberti* N. E. Brown. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1983,

Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: SBF/EMPASC, 1984. v. 3, p. 989-993.

OLIVEIRA, J. C.; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA F. R. Determinação de fonte de resistência em *Passifloraceas* quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília, 1986. v. 2, p. 403-408.

PACE, C. A. M. Comparação de quatro métodos de enxertia para o maracujazeiro-amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1983, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBF/EMPASC, 1984. p. 983-988.

PASQUAL, M. **Propagação de Plantas Ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80p.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nítida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 380-381, ago. 2004.

PAULA, M. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P. BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Diversidade genética de espécies de *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, com base em marcadores RAPD. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados**, 4, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 100-104. 2005.

PEREIRA, K. J. C.; DIAS, D. C. F. S. Germinação e vigor de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) submetidas a diferentes métodos de remoção da mucilagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 288-291, 2000.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. São Paulo: Globo, 1997. 359 p.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; FILHO, G. C. N.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 552-554, dez. 2004.

ROSSETTO, C. J.; NAGAI, V.; IGUE, T.; ROSSETTO, D.; MIRANDA, M. A. C. Preferência de alimentação de adultos de *Diabrotica speciosa* (Germar) e *Cerotoma arcuata* (Oliv.) em variedades de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 1, p. 179-183, 1981.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E. KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. **Frupex Maracujá para exportação**: aspectos técnicos da produção 19. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 64 p.

SANTOS, M. R. A.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, L. V. Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* Grisebach. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 319-324, mar./abr. 2003.

SHARMA, R. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; GOMES, A. C. Reação de espécies de *Passiflora* a nematóides-das-galhas. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro**: trabalhos apresentados, 4., Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 183-186. 2005.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS DA GERMINAÇÃO *in vitro* DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO *Passiflora gibertii* N. E. BROWN

RESUMO

FIGUEIREDO, Milene Alves. Aspectos da germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown. In: _____. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. p.17-31. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Espécies não cultivadas de *Passiflora* spp. apresentam dificuldades na germinação de sementes, problema comum em plantas silvestres. A germinação *in vitro* favorece a manutenção e a propagação de material. Este trabalho teve como objetivo estudar a germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora gibertii*. Sementes de frutos maduros foram lavadas em água corrente e, posteriormente, colocadas para secar à sombra por quatro dias (sementes secas). Após esse período, novas sementes foram isoladas dos frutos e lavadas em água corrente (sementes frescas). Foram testados diferentes tipos de escarificação (ausência de escarificação, retirada da ponta da semente com pinça e bisturi e retirada da ponta da semente com lixa manualmente). Após escarificação, sementes assépticas foram inoculadas em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com diferentes concentrações de GA₃ (0; 28,87; 57,74; 86,61 e 115,47 µM), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculadas, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2° C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação foi realizada em intervalos de dois dias durante 45 dias, sendo observados a percentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG) em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protundida. Melhores resultados para as variáveis percentagem de germinação e índice de velocidade de germinação são obtidos com a utilização de escarificação da ponta das sementes

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador).

com bisturi. As sementes frescas obtêm maior percentagem de germinação que as secas, porém, com maior percentagem de germinação para sementes secas quando se utiliza escarificação da ponta da semente. A espécie nativa *Passiflora gibertii* N. E. Brown possui dormência extra-embriônica mecânica, que é superada com a escarificação da ponta da semente com bisturi.

***In vitro* GERMINATION ASPECTS OF *Passiflora gibertii* N. E. BROWN SEEDS**

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Milene Alves. *In vitro* germination aspects of *Passiflora gibertii* N. E. Brown seeds. In: _____. **Production, morphologic and ultra-structural analyses of *Passiflora* spp. callus.** 2007. p.17-31. Dissertation (Master's degree in Agronomy/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

Non cultivated species of *Passiflora* spp. present seed germination difficulties, a common problem in wild plants. The *in vitro* germination favors the material propagation and maintenance. The objective of this work was to study the *in vitro* germination of *Passiflora gibertii* seeds. Ripe fruit seeds were washed in running water and, dried in the shade for four days (dry seeds). After this period, new seeds were isolated from fruits and washed in running water (fresh seeds). Different scarification methods (no scarification, seed tip withdraw with forceps and scalpel and seed tip withdraw with manual sanding) were tested. After scarification, aseptic seeds were inoculated in MS culture medium, containing half of its salt concentration, supplemented with different GA₃ concentrations (0; 28,87; 57,74; 86,61 and 115,47 μM), sucrose (3%) and solidified with agar (0,5%). After inoculated, the seeds were maintained in a growth room, under photons irradiance of 36 μmol m⁻² s⁻¹, temperature of 25±2° C and photoperiod of 16 hours. The evaluation was accomplished in two days intervals for 45 days, being observed the germinated seeds percentage and the germination speed index (IVG) in each treatment. It was considered germinated the seed that presented radicle. Better results for the variables germination percentage and germination speed index were obtained with the use of seeds tip scarification with scalpel. Fresh seeds present larger germination percentage than dry seeds, however, larger germination percentage for dry seeds are obtained using tip scarification. The native species *Passiflora gibertii* N. E. Brown has mechanical extra-embryonic dormancy, that is overcome with seed tip scarification using a scalpel.

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - UFLA (Advisor).

1 INTRODUÇÃO

O estabelecimento dos bancos ativos de germoplasma (BAGs) *in vitro* tem sido bem sucedido para algumas espécies de maracujazeiro, especialmente as que exigem produção de matrizes livres de vírus, com a vantagem da economia de espaço e simplificação nos procedimentos de intercâmbio e quarentena de plantas. A falta de protocolos de regeneração e conservação *in vitro* não tem permitido, ainda, o uso extensivo deste processo de manejo de germoplasma (Meletti et al., 2004; Passos et al., 2004). A necessidade de repetidas subculturas, a exigência de infra-estrutura e de mão-de-obra especializadas e a freqüente contaminação fitossanitária têm dificultado o processo (Meletti et al., 2004).

A espécie *Passiflora gibertii* N. E. Brown possui grande potencial de utilização como porta-enxerto e também no melhoramento, pela sua resistência à morte prematura, à cladosporiose, à bacteriose, à antracnose e a nematóides (Junghans et al., 2006b; Junqueira et al., 2005; Oliveira & Ruggiero, 1998; Sharma et al., 2005). Plântulas germinadas *in vitro* podem constituir ótima fonte de explantes para estudos de morfogênese. Todavia, sementes do maracujazeiro apresentam problemas de dormência sob condições *in vitro*, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes (Junghans et al., 2006a).

Pesquisas recentes mencionam a germinação *in vivo* de *Passiflora gibertii* sob viveiro com sombrite de 50% de sombreamento, em tubetes com casca de *Pinus* e carvão ativado, com uma taxa de germinação de 47%, que é considerada baixa (Roncatto et al., 2006). Percentuais baixos (30%) foram também obtidos com a mesma espécie, para a germinação de sementes em temperatura alternada (30°-20°C), em câmara BOD, em papel germitest (Filho et al., 2000).

A desinfestação superficial dos frutos, a escarificação das sementes e a utilização de água destilada autoclavada, como meio de cultura na germinação *in vitro* de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), proporcionaram altas taxas de germinação (86,67%) e de plântulas normais (96,15%) em tempo satisfatório, equivalente à germinação *in vivo*, com a vantagem de proporcionar plantas matrizes completamente assépticas, o que é altamente vantajoso quando utilizadas na cultura de tecidos (Bento et al., 2002).

Para a cultura do maracujazeiro, não existem informações suficientes sobre a germinação *in vitro*. Isto demonstra a importância deste tipo de estudo para contribuir no sucesso da fase de estabelecimento da micropropagação por meio de sementes. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal, foram utilizados frutos maduros de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown - acesso CPAC MJ-22-01 da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), Planaltina, DF, coletados em julho de 2006.

Após a abertura dos frutos por corte longitudinal, as sementes foram lavadas em água corrente, com peneira, para a retirada do arilo. Posteriormente, foram colocadas para secar à sombra por quatro dias (sementes secas). Após quatro dias, novos frutos foram abertos por corte longitudinal, isolando-se as sementes que foram lavadas em água corrente, com peneira para a retirada do arilo (sementes frescas).

Os dois grupos de sementes foram transferidos para câmara de fluxo laminar, no qual, com peneira para apará-las, foram imersas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito) por 20 minutos e lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Foram testados diferentes tipos de escarificação (ausência de escarificação, retirada da ponta da semente com pinça e bisturi e retirada da ponta da semente com lixa, manualmente).

Sementes cujas pontas foram escarificadas com lixa, foram imersas em álcool 70% (v/v), por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito), por 10 minutos e lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada. Após escarificadas manualmente, foram imersas novamente em NaOCl, com 1% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito), por 10 minutos e lavadas 3 vezes em água destilada e

autoclavada. Após escarificação, sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) (Anexo 1) contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com diferentes concentrações de GA₃ (0; 28,87; 57,74; 86,61 e 115,47 µM), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%). O pH do meio foi ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem, a 120°C, durante 20 minutos. Após inoculadas, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação foi realizada em intervalos de dois dias, durante 45 dias, sendo observados a percentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG), em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protundida.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo 3x2x5 (tipo de escarificação, tipo de semente e concentração de GA₃), com quatro repetições por tratamento, cada uma composta por cinco tubos de ensaio, cada tubo contendo uma semente. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software estatístico Sisvar[®], sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante das análises efetuadas, os resultados do resumo da análise de variância dos fatores avaliados estão apresentados na Tabela 1. Observa-se interação significativa entre o tipo de semente (fresca ou seca) utilizada e o modo de esscarificação.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) *in vitro* de *Passiflora gibertii*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	QM	
		Germinação (%)	IVG
Semente (S)	1	7053,333*	1,34*
GA ₃	4	120	0,02
Escarificação (E)	2	70330*	7,9*
S x GA ₃	4	270	0,05
E x GA ₃	8	55	0,01
S x E	2	5503,33*	0,96*
S x E x GA ₃	8	220	0,03
Resíduo	90	264,44	0,02
CV (%)		33,19	33,61

*Significativo a 1%, pelo teste F.

De acordo com as observações, o melhor resultado para a variável percentagem de germinação foi obtido com a utilização de esscarificação da ponta das sementes secas (91%) (Figura 1). Observa-se que, para as sementes frescas, não houve diferença estatística entre esscarificação da semente com lixa (74%) e retirada da sua ponta (86%). Porém, esta última, apresentando maior percentagem, tanto para sementes frescas como para sementes secas, pode ser indicada como a melhor forma de esscarificação para a quebra de dormência das

sementes de *Passiflora gibertii in vitro*. A ausência de escarificação proporcionou as menores taxas de germinação, tendo, para as sementes secas, havido ausência de germinação e para sementes frescas apenas 10% (Figura 1). Estes resultados permitem concluir que a espécie *Passiflora gibertii* possui dormência extra-embriônica, superada facilmente pela quebra da ponta da semente, ou seja, por ação mecânica.

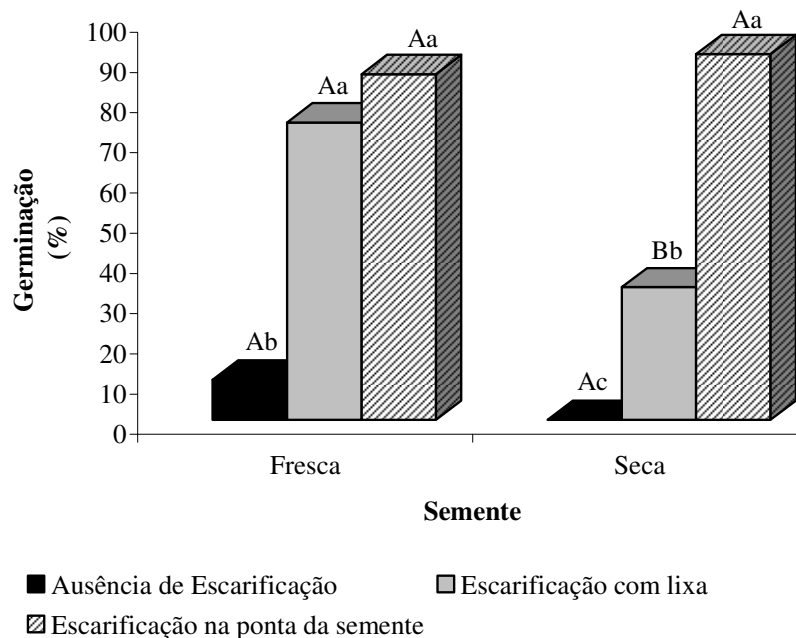


FIGURA 1. Percentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora gibertii* provenientes de diversos métodos de quebra de dormência. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com Junghans et al. (2006a) que recomendam a retirada parcial do tegumento das sementes de *Passiflora gibertii* para a obtenção de plântulas *in vitro*. No entanto,

os autores obtiveram, com o tratamento mecânico, 58% de germinação *in vitro*, que é considerado baixo, enquanto que, no atual trabalho, o maior percentual de germinação obtido foi de 91%. Provavelmente, os autores citados utilizaram método de escarificação que não expõem o embrião, como ocorre quando se retira a ponta do tegumento ou coletaram frutos em época diferente da utilizada no presente trabalho.

Hall et al. (2000), em estudos com o híbrido australiano (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), constataram insucesso da germinação *in vitro* de sementes.

De maneira geral, as sementes frescas obtiveram maior percentagem de germinação (56,67%) que as secas (41,33%), porém, com maior percentagem de germinação para sementes secas (91%), quando se utilizou escarificação da ponta da semente. Correa et al. (2006), estudando o armazenamento de maracujazeiro doce (*Passiflora alata* Dryander), obtiveram resultados contrastantes, nos quais a percentagem de emergência de plântulas foi menor em sementes úmidas do que aquelas que secaram à sombra por três dias.

O maior índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido para sementes frescas com escarificação de suas pontas (0,92) (Figura 2). Para sementes secas, foi observado resultado semelhante (0,88). Assim como os resultados obtidos para percentagem de germinação *in vitro*, a ausência de escarificação obteve a velocidade mais lenta para sementes frescas (0,03) e secas (0) (Figura 2), corroborando com os resultados anteriores.

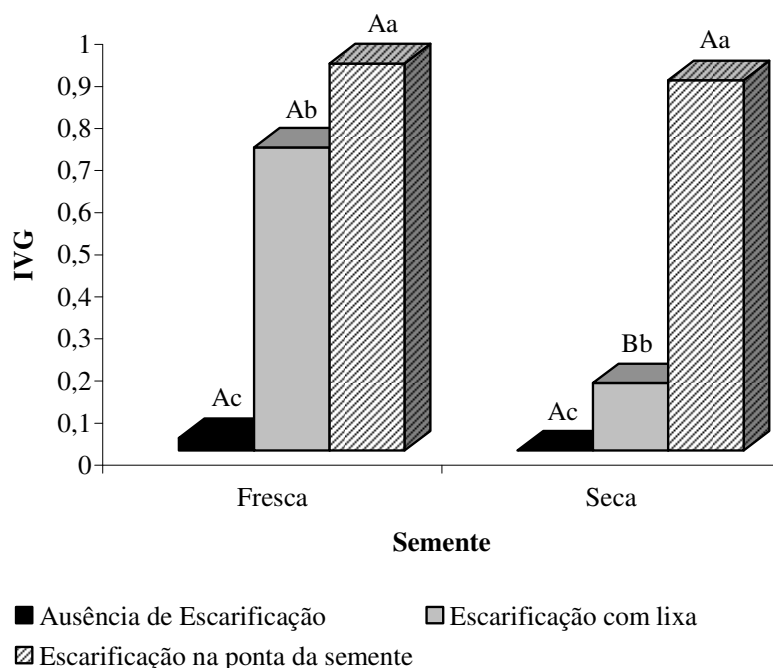


FIGURA 2. Índice de velocidade de germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora gibertii* provenientes de diversos métodos de quebra de dormência. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Em Lima et al. (2006), o índice de velocidade de emergência (IVE) de *Passiflora gibertii* foi de 16,10 dias, sendo superior à espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* (8,85), que obteve a maior velocidade de emergência. As espécies *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* apresentaram melhores índices de velocidade de emergência e germinação. Confirmando os resultados obtidos no presente trabalho, a partir dos resultados de Lima et al. (2006), conclui-se que, para tornar a germinação de *Passiflora gibertii* economicamente viável, devem-se utilizar diferentes métodos de quebra de dormência. Melo et al. (2000) afirmam que é muito comum a baixa germinação de espécies não domesticadas de maracujazeiro. Até que se chegue ao ponto expressivo de germinação, é

necessário avaliar e desenvolver técnicas, daí a grande importância de realizarem-se pesquisas com estas espécies. A médio e longo prazos, o melhoramento genético vegetal deverá selecionar plantas dentro das populações, considerando a taxa de germinação das sementes, juntamente com outras características agronômicas.

4 CONCLUSÕES

Melhores resultados para as variáveis percentagem de germinação e índice de velocidade de germinação são obtidos com a utilização de escarificação da ponta das sementes com bisturi.

As sementes frescas obtêm maior percentagem de germinação que as secas, porém, com maior percentagem de germinação para sementes secas, quando se utiliza escarificação da ponta da semente.

A espécie nativa *Passiflora gibertii* N. E. Brown possui dormência extra-embriônica mecânica, que é superada com a escarificação da ponta da semente com bisturi.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTO, D. M.; LOPES, A. C. J.; MARTINS, K.; DINIZ, G. E. M.; MARTINS, C. P.; MACEDO, C. E. C.; ALLOUFA, M. A. I. **Germinação *in vitro* de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) em diferentes meios de cultura.** 2002. Disponível em: www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/768.htm. Acesso em: 02 jan. 2007.

CORREA, L. S.; ANSELMO, J. L.; BOLIANI, A. C.; SANTOS, P. C. Efeito do armazenamento de sementes sobre a emergência e desenvolvimento das plântulas de maracujazeiro doce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio-RJ. **Palestras e resumos...** Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRuralRJ, 2006. p. 177.

FILHO, J. D.; VASCONCELLOS, M. A. S.; CARVALHO, C. M.; LEONEL, S. Germinação de sementes de *Passiflora gibertii* N. E. Brown sob temperatura controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 22, n. 3, p. 468-470, dez. 2000.

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

JUNGHANS, T. G.; VIANA, A. J. C.; JUNGHANS, D. T. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá *gibertii* com e sem tegumento parcialmente removido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio-RJ. **Palestras e resumos...** Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRuralRJ, 2006a. p. 191.

JUNGHANS, T. G.; VIANA, A. J. C.; JUNGHANS, D. T. Período de armazenamento e tratamento mecânico na germinação de sementes de maracujá *gibertii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio-RJ. **Palestras e resumos...** Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRuralRJ, 2006b. p. 191.

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, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

LIMA, A. A.; CALDAS, R. C.; SANTOS, V. S. Germinação e crescimento de espécies de maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 125-127, abr. 2006.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A. **Criopreservação de sementes de três espécies de maracujazeiro**. 2004. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/centros/fruticultura/trabalhosmaracujacrio.htm>. Acesso em 02/01/2007.

MELO, A. L.; OLIVEIRA, J. C.; VIEIRA, R. D. Superação de dormência em sementes de *Passiflora nitida* H. B. K. com hidróxido de cálcio, ácido sulfúrico e ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 260-263, Ago. 2000.

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.

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

PASSOS, I. R. da S.; MATOS, G. V da C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 380-381, ago. 2004.

RONCATTO, G.; LENZA, J. B.; VALENTE, J. P.; FERREIRA, L. G.; DAMASCENO, M. A. P. Avaliação da germinação de espécies nativas de maracujazeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio-RJ. **Palestras e resumos...** Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRuralRJ, 2006. p. 165.

SHARMA, R. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; GOMES, A. C. Reação de espécies de *Passiflora* a nematóides-das-galhas. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica**

de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados, 4. Planaltina, DF:
Embrapa Cerrados, 2005. p. 183-186.

CAPÍTULO 3

INDUÇÃO DE CALOS EM *Passiflora* spp.

RESUMO

FIGUEIREDO, Milene Alves. Indução de calos em *Passiflora* spp. In: _____. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. p. 33-61. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A regeneração de plântulas *in vitro* para espécies de *Passiflora* spp. nativas, com características agronômicas, poderá fornecer subsídios importantes para o melhoramento genético. Objetivou-se estabelecer um protocolo para a indução de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. Foram testados diferentes segmentos (foliares, nodais e radiculares) de *P. gibertii* N. E. Brown e *P. edulis edulis*, concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM), concentrações de sais do meio MS (MS e $\frac{1}{2}$ MS), ambientes de cultivo (no escuro à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e 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), necessidade da adição de água de coco ao meio de cultura e concentrações de picloram e 2,4-D combinados com cinetina em *P. gibertii*. Os resultados permitem afirmar que a espécie *P. gibertii* responde melhor à formação de calos que *P. edulis edulis* nativo; a utilização de 8,88 μM de BAP promove maior percentagem de calos a partir de segmentos foliares; segmentos radiculares de *P. gibertii* e *P. edulis edulis* nativo, nos tratamentos utilizados, não formam calos e não há diferença entre segmentos nodal e foliar na formação de calos de espécies de *Passiflora* nativo; segmentos nodal e foliar de *P. gibertii*, após transferidos para meio MSM contendo GA_3 , formam gemas; calos oriundos de condições de escuro são mais responsivos à formação de gemas de *P. gibertii* e, no intuito de reduzir os gastos na cultura *in vitro*, pode-se sugerir que o meio de indução mais indicado para organogênese de *P. gibertii* é o meio MS contendo metade da concentração de seus sais e mantido no escuro. A adição de água de coco ao meio de cultura é essencial, tanto para indução de calos como para formação de

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador).

gemas em *P. gibertii*. A adição de picloram e cinetina ao meio de cultura promove maior formação de calos em explantes foliares cotiledonares de *P. gibertii* que 2,4-D e cinetina. Diferentes colorações de calos oriundos de explantes foliares cotiledonares são observadas nos tratamentos utilizando-se picloram e cinetina.

CALLUS INDUCTION IN *Passiflora* spp.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Milene Alves. Callus induction in *Passiflora* spp. In: _____. **Production, morphologic and ultra-structural analyses of *Passiflora* spp. callus.** 2007. p.33-61. Dissertation (Master's degree in Agronomy/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

In vitro seedlings regeneration of native *Passiflora* spp. species, with agronomic characteristics, can supply important subsidies for plant breeding. The objective of this work was to establish a protocol for callus induction in two species of native passion fruit plant. Different segments (leaf, nodal and roots) of *P. gibertii* N. E. Brown and *P. edulis edulis*, BAP concentrations (0; 2,22; 4,44; 6,66 and 8,88 μM), MS medium salt concentrations (MS and $\frac{1}{2}$ MS), culture environments (in the dark at temperature of $25\pm 2^\circ\text{C}$ and 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), presence and absence need of coconut water were tested. The use of 2,4-D and picloram concentrations combined with kinetin were tested only in *P. gibertii*. The results allow to infer that the *P. gibertii* species respond better to callus formation than native *P. edulis edulis*; the use of 8,88 μM BAP promotes larger callus percentage from leaf segments; root segments of *P. gibertii* and native *P. edulis edulis* do not form callus and there is not difference between leaf and nodal segments in the formation of native *Passiflora* species callus; *P. gibertii* leaf and nodal segments, after transferred to MSM medium containing GA_3 , form bud; callus from dark conditions are more responsive to bud formation in *P. gibertii*; MS medium containing half of its salts concentration is the most indicated for organogenesis; the addition of coconut water to the culture medium is essential for callus induction and bud formation in *P. gibertii*. The picloram and kinetin addition to the culture medium promotes larger callus formation in cotyledonary leaf explants of *P. gibertii* than 2,4-D and kinetin. Different callus colors, from the cotyledonary leaf explants, are observed in treatments using picloram and kinetin.

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - UFLA (Advisor).

1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies não cultivadas de maracujazeiro, como *Passiflora gibertii* N. E. Brown e *Passiflora edulis edulis*, têm acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentarem resistência a doenças (Barbosa, 1995; Kuroda, 1981; Oliveira, 1987) e a pragas, maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas.

Existem vários estudos sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora*, mas a variação da resposta entre genótipos contribui para que o assunto não seja extinto. Essa variação ocorre, principalmente, em espécies silvestres de maracujazeiro, nas quais a variabilidade genética existente é muito grande. Os diferentes explantes utilizados também contribuem para a variabilidade da resposta de regeneração *in vitro*.

A regeneração *in vitro* pode seguir duas vias: a organogênese ou a embriogênese somática. Estas vias podem ser realizadas de forma indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente. No caso da organogênese, ocorre a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. Um protocolo de regeneração de plantas *in vitro* é, portanto, imprescindível para a multiplicação de plântulas com características agronômicas desejáveis de diferentes espécies de *Passiflora* spp. (Monteiro-Hara, 2000; Moura et al., 2001).

Para espécies de *Passiflora*, a regeneração pela micropropagação vem sendo obtida por vários autores. A maioria dos reguladores vegetais utilizados é do grupo das citocininas, principalmente BAP (benzilaminopurina), KIN

(cinetina) e zeatina, podendo ser combinadas de auxinas como ANA (ácido naftalenoacético), AIA (ácido indolacético) ou 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético) (Monteiro-Hara, 2000).

O BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e a indução de gemas adventícias (Grattaplagia & Machado, 1998). A razão da maior eficiência do BAP, seguida em ordem decrescente por cinetina (CIN) e isopenteniladenina (2iP), pode estar na capacidade de os tecidos vegetais metabolizarem os hormônios naturais mais rapidamente do que os reguladores de crescimento. Isso, entretanto, não é uma regra absoluta e, conforme a espécie, outras citocininas podem apresentar melhores resultados (Grattaplagia & Machado, 1998). Especificamente quanto ao processo de embriogênese somática *in vitro*, as auxinas desempenham papel essencial na indução do embrião somático em cultura e posterior desenvolvimento desse embrião (Zimmerman, 1993). O regulador mais utilizado com esse propósito é o 2,4-D (Dornellas et al., 1992; Zuo et al., 2002), que pode vir acompanhado de citocininas, como a cinetina. Outro regulador interessante a ser estudado é a auxina picloram, que promove alta indução de calos (Figueiredo et al., 2000; Rosal, 2004; Stella & Braga, 2002).

Ribas (2001), estudando as técnicas de propagação *in vitro* de diferentes acessos do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), estabeleceu concentração de 8,88 μM de BAP para a regeneração de gemas adventícias (a partir de explantes foliares de material adulto) que, por sua vez, eram pequenas, não alongaram e tornaram-se cloróticas.

A organogênese em *Passiflora cincinnata* Mast ocorre direta e indiretamente, dependendo do explante e ou do tempo de cultivo *in vitro*. É um processo assincrônico e o regulador vegetal 6-BA favorece o processo, sendo

imprescindível a sua adição para a resposta organogênica do disco foliar (Lombardi, 2003).

A formação de gemas *in vitro* em espécies de *Passiflora* já foi verificada a partir de explantes cotiledonares, hipocotiledonares, segmentos de entrenó e segmentos radiculares (Fernando et al., 2005).

Segundo Torres et al. (2001), os aditivos orgânicos complexos podem ser adicionados ao meio, visando melhor resposta no padrão de crescimento. A adição de água de coco, 2iP e ANA estimula o rápido crescimento e a progressão de culturas de calo em eixo embrionário, segmentos caulinares e segmentos de folhas jovens clorofiladas (Ledo et al., 2002). Segundo Hall et al. (2000), para muitas espécies, incluindo *Passiflora*, a água de coco contém substâncias de crescimento essenciais para uma maior regeneração. Lombardi (2003) afirma que o número de explantes com brotos obtidos de diferentes espécies de *Passiflora* foi também maior quando combinado BAP e água de coco.

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), a água de coco é o líquido do endosperma de sementes de coco que contém citocininas e outros fatores nutricionais. A zeatina, uma citocinina de ocorrência natural que estimula a divisão de células vegetais maduras, foi identificada na água de coco. Algumas culturas possuem necessidade desse hormônio vegetal para o melhor desenvolvimento e produtividade no meio de cultura e, para outras, esse componente é fator de sucesso ou insucesso no cultivo *in vitro* (Cardoso, 2007).

A composição da água de coco e da polpa depende de fatores, como variedade da palmeira, grau de maturação e natureza do solo no qual o fruto cresceu (Aleixo et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi o de estabelecer um protocolo para a indução de calos em diferentes segmentos de duas espécies de maracujazeiro nativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos organogênicos em diferentes explantes

2.1.1 Material vegetal

Explantes foliares, nodais e radiculares foram obtidos de plântulas germinadas *in vitro* de duas espécies de maracujazeiro nativo: *Passiflora gibertii* N. E. Brown - acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF e *Passiflora edulis edulis* - acesso CPAC MJ-21-10, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), Planaltina, DF.

2.1.2 Calogênese

As folhas foram excisadas em diâmetros de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e os explantes nodais e radiculares com $\approx 1 \text{ cm}$ de comprimento. Nos explantes foliares foram efetuados pequenos cortes na face abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) (Anexo 1) 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 (0,5%), antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos.

No primeiro experimento, foram adicionadas ao meio MS diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM), inoculando-se segmentos foliares e radiculares das duas espécies.

Em um segundo experimento, os segmentos foliares e nodais das duas espécies foram inoculados em meio MS acrescido de 4,44 μM de BAP.

Após a inoculação, os 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.

Para análise estatística, os calos foram classificados nas seguintes categorias: 0 = ausência de calos; 1 = explantes intumescido; 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 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante foliar. Todos 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.

2.1.3 Organogênese

Os calos formados (do segundo experimento) foram transferidos para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (4,44 μM), sacarose (3%), água de coco (5%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculação, os 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 quatro meses (122 dias).

Após esse período, calos organogênicos foram transferidos para meio de cultura MSM (Monteiro et al., 2000a) (Anexo 2), específico para maracujazeiro, suplementado com sacarose (3%) e GA_3 (2,89 μM), e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas acima, por 30 dias. O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e os meios solidificados com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos.

2.2 Indução de calos organogênicos a partir de segmentos foliares de *Passiflora gibertii*

2.2.1 Material vegetal

Plantas matrizes jovens de maracujazeiro *Passiflora gibertii* - acesso CPAC MJ-22-01 foram germinadas *in vivo* e mantidas em sala de crescimento, a $25\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. A idade das plantas foi de 52 e 109 dias, para o primeiro e o segundo experimento, respectivamente.

2.2.2 Calogênese

Para a desinfestação, as folhas foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 0,5% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito) por 10 minutos e, posteriormente, lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Após desinfestação, as folhas foram excisadas em diâmetros de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e os explantes receberam pequenos cortes por toda a superfície, com bisturi e inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

No primeiro experimento, foram testadas diferentes concentrações dos sais do meio MS (MS e $\frac{1}{2}$ MS), suplementado com BAP ($8,88 \mu\text{M}$), sacarose (3%), água de coco (5%) e solidificado com ágar (0,5%).

No segundo experimento, foi testado meio MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido ou não de água de coco (5%), suplementado com BAP ($8,88 \mu\text{M}$), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%).

O pH dos meios foi ajustado para $5,8\pm 1$, antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos.

Após inoculação, os explantes do primeiro experimento foram mantidos em dois ambientes: no escuro, à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e 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. Explantes do segundo experimento foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 25±2°C, por 30 dias.

Para análise estatística, os calos foram classificados nas seguintes categorias: 0 = ausência de calos; 1 = explantes intumescido; 2 = início da calogênese; 3 = 50% do explante coberto por calos; 4 = mais que 50% do explante coberto por calos e 5 = explante totalmente coberto por calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 12 repetições por tratamento, para o primeiro experimento e de 45 repetições por tratamento, para o segundo experimento. Todos 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.

2.2.3 Organogênese

Após trinta dias, explantes com calos foram transferidos para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (2,22 µM), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas, por 30 dias. Após esse período, calos organogênicos foram transferidos para meio de cultura MSM, suplementado com sacarose (3%) e GA₃ (2,89 µM), e mantidos em sala de crescimento, nas mesmas condições citadas acima, por 30 dias. O pH dos meios foi ajustado para 5,8±0,1 e os meios solidificados com ágar (0,5%), antes da autoclavagem, a 120°C, durante 20 minutos.

2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares cotiledonares de *Passiflora gibertii*

2.3.1 Material vegetal

Plantas obtidas conforme item 2.2.1 deste capítulo, porém, com 45 dias de idade.

2.3.2 Calogênese

Para a obtenção de calos embriogênicos, foram utilizadas folhas cotiledonares que foram desinfestadas e inoculadas conforme item 2.2.2 deste capítulo. Porém, o meio de cultura utilizado foi MS, contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com sacarose (3%) e de diferentes concentrações de picloram (0; 2,07; 4,14; 6,21 e 8,28 μM) ou 2,4-D (0; 2,26; 4,52; 6,79 e 9,05 μM) combinadas com cinetina (0 e 0,46 μM). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$, antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos. Após inoculados, explantes foram mantidos no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias.

A classificação dos calos foi idêntica à análise estatística do item 2.2.2 deste capítulo e o delineamento experimental utilizado igual ao primeiro experimento do item 2.2.2 deste capítulo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos organogênicos em diferentes explantes

As diferentes espécies de *Passiflora* spp. e as concentrações de BAP diferiram estatisticamente na indução de calos. Porém, o tratamento utilizando segmento radicular não houve formação de calos.

Melhores resultados para calogênese a partir de segmentos foliares foram observados para a espécie *Passiflora gibertii*, com maior escore (1,0) na concentração de 8,88 μM de BAP (Figura 1). *Passiflora edulis edulis* obteve uma pequena formação de calos, com maior escore de 0,3 na concentração de 6,66 μM de BAP (Figura 1).

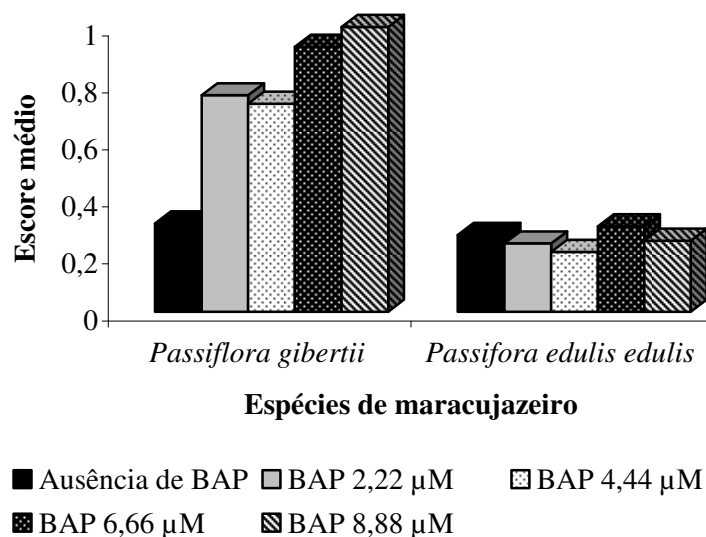


FIGURA 1. Indução de calos em segmentos foliares de *P. gibertii* e *P. edulis edulis*, em meio MS, na presença de diferentes concentrações de BAP aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Estes resultados confirmam a existência da variação da resposta entre

genótipos de diferentes acessos de maracujazeiro nativo, tornando-se, então, necessário o estudo de cada espécie.

Pode-se observar, ainda, que, na ausência de BAP, não houve boa indução de calos na espécie *P. gibertii*, mostrando, assim, a importância desse regulador na formação de calos para essa espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro et al. (2000b) que, utilizando explantes foliares de *Passiflora suberosa*, obtiveram calos, cultivados na ausência de luz, com aspecto semelhante ao obtido no presente trabalho, utilizando 2,22 e 4,44 μM de BAP em meio MS acrescido de sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,8%).

Dornelas & Vieira (1994), utilizando espécies de *Passiflora*, observaram organogênese indireta a partir de cotilédone, hipocótilo e discos foliares cultivados em meio contendo 4,44 μM de BAP, sob condições de 16 horas de luz. Lombardi (2003) obteve organogênese indireta, a partir de discos foliares, em *P. cincinnata* em meio MS contendo diferentes concentrações (2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM) do regulador 6-BA e 5% de água de coco. Porém, diferindo do resultado obtido no presente trabalho, Lombardi (2003) obteve organogênese, tanto direta como indireta, em segmentos radiculares de *P. cincinnata* cultivados em meio MS contendo 6-BA e 5% de água de coco.

Não houve diferença estatística entre os diferentes explantes utilizados para a indução de calos (Figura 2), tendo a melhor resposta sido obtida para segmento nodal em *P. gibertii*, com escore de 0,8 e segmento foliar para *P. edulis edulis*, com escore de 0,32.

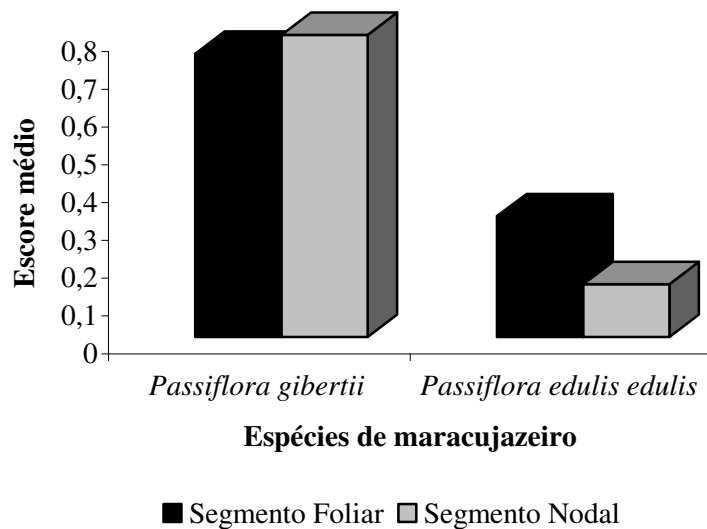


FIGURA 2. Indução de calos em segmentos foliares e nodais de *P. gibertii* e *P. edulis edulis* em meio MS, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Após quatro meses em sala de crescimento, alguns explantes foliares (Figura 3a) e nodais (Figura 4a) com calos de *Passiflora gibertii* formaram gemas na superfície, em meio MS que, ao serem transferidos para meio de cultura MSM, suplementado com sacarose (3%) e GA₃ (2,89 μM), desenvolveram plântulas (Figuras 3b e 4b).

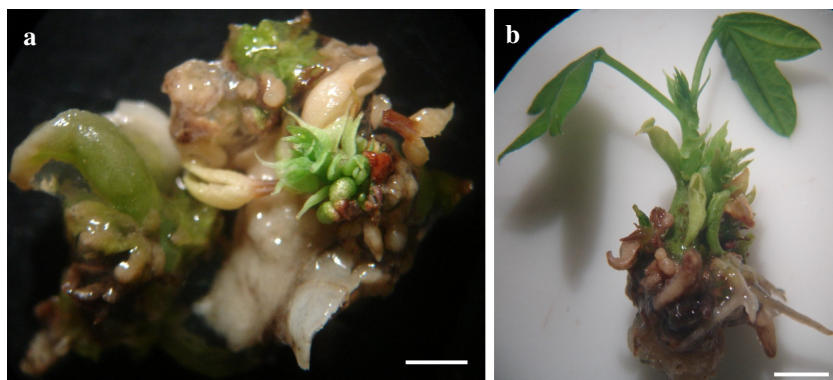


FIGURA 3. (a) Calos organogênicos obtidos de segmentos foliares de *P. gibertii* cultivados em meio MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (4,44 μM) e água de coco (5%), aos 122 dias de cultivo. (b) Plântula obtida de calo organogênico cultivado em meio MSM suplementado com GA_3 (2,89 μM), aos 30 dias de cultivo. Barra = 3 mm (a, b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

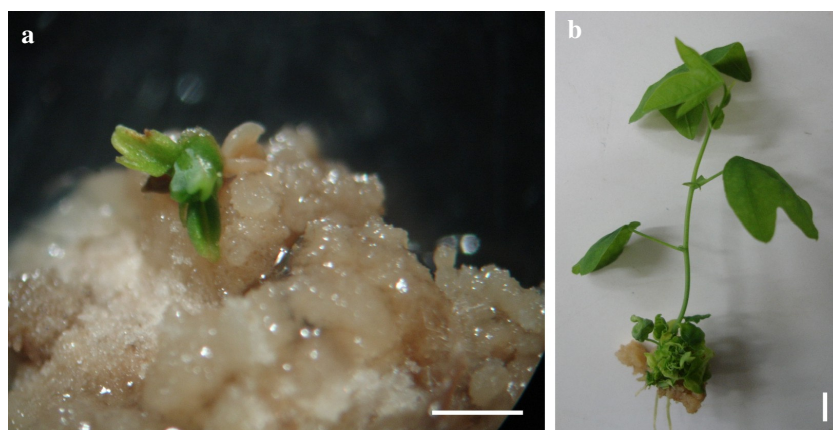


FIGURA 4. (a) Calos organogênicos obtidos de segmentos nodais de *P. gibertii* cultivados em meio MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (4,44 μM) e água de coco (5%), aos 122 dias de cultivo. (b) Plântula obtida de calo organogênico cultivado em meio MSM suplementado com GA_3 (2,89 μM), aos 30 dias de cultivo. Barra = 3 mm (a), 5 mm (b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Dornelas & Vieira (1994) avaliaram o efeito de diferentes fontes de explante e concentrações de fitorreguladores na cultura *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Estes autores observaram que a formação de gemas ocorreu sem a fase de calo e que o meio MS, acrescido de 8,88 µM de BA e 10% de água de coco, favoreceu a organogênese nos explantes cotiledonares e hipocotiledonares. Já para os explantes foliares, foram necessárias concentrações de 4,44 µM de BA e 10% de água de coco para promover a organogênese. Similarmente, Hall et al. (2000) verificaram a influência do explante, bem como da adição de água de coco na organogênese do híbrido australiano *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores enfatizaram que os explantes cotiledonares foram mais eficientes que os explantes foliares no processo de regeneração e que a adição de 10% de água de coco ao meio MS contendo 8,88 µM de BA promoveu um rápido desenvolvimento de gemas.

Na organogênese *in vitro*, em diferentes acessos de maracujazeiro azedo, cultivados em meio MS suplementado com 8,88 µM de BAP, o segmento nodal apresentou melhor desempenho no cultivo, com produção de maior número de brotações; os piores resultados foram obtidos com o fragmento foliar, que não produziu brotações. Foram observados, em cortes histológicos, numerosos meristemóides e gemas sem conexão vascular com os tecidos originais (Ribeiro et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, em que o meio MS, contendo metade da concentração de seus sais e suplementado com 8,88 µM de BAP em segmentos nodais de *P. gibertii*, obteve maior indução de calos.

Monteiro et al. (2000b), de forma semelhante ao presente trabalho, observaram a formação de gemas a partir de calos de *Passiflora suberosa*, após o cultivo em meio de cultura MSM acrescido de 2,89 µM de GA₃. Entretanto, apesar da produção de calo em 100% dos explantes foliares, a formação de gemas a partir dessa região proliferada foi considerada baixa.

O processo organogênico *in vitro* em *P. edulis* f. *flavicarpa* população FB-100 caracterizou-se pela formação de primórdios foliares, gemas e protuberâncias em ambas as extremidades dos explantes hipocotiledonares e na superfície abaxial dos explantes foliares, principalmente na região da nervura central. A formação de calo foi verificada somente nos explantes hipocotiledonares (Fernando et al., 2005).

3.2 Indução de calos organogênicos a partir de segmentos foliares de *Passiflora gibertii*

Não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações do meio de cultura MS nos diferentes ambientes para indução de calos (Figura 5), tendo a melhor resposta sido obtida em explantes cultivados na luz com escore de 0,58, independente da concentração do meio de cultura.

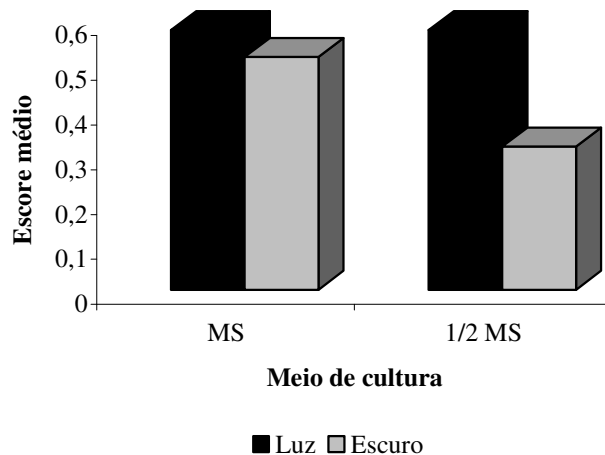


FIGURA 5. Indução de calos em segmentos foliares de *P. gibertii*, em diferentes concentrações do meio MS e em diferentes ambientes, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Entretanto, quando os explantes com calos foram transferidos para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (2,22 μ M) e mantidos em sala de crescimento na luz, apenas alguns explantes oriundos do cultivo no escuro formaram gemas aos 30 dias. Após esse período, quando calos organogênicos foram transferidos para meio de cultura MSM suplementado com GA₃ (2,89 μ M) e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas acima, apenas um explante oriundo do cultivo na luz formou gemas (Figura 6b). Já vários explantes oriundos do cultivo no escuro formaram gemas (Figura 6a), aos 30 dias de cultivo, porém, nenhuma gema se desenvolveu em plântula.

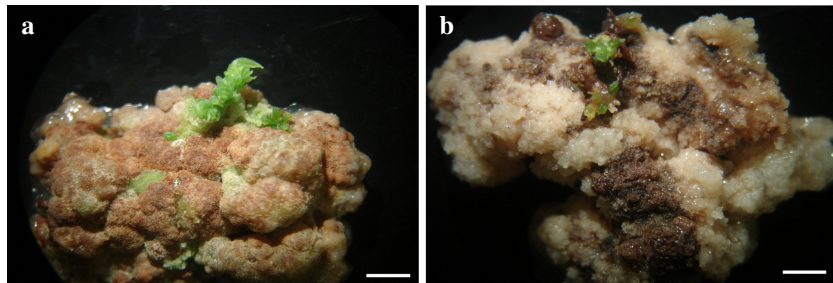


FIGURA 6. Calos organogênicos obtidos de segmentos foliares de *P. gibertii* oriundos do escuro (a) e da luz (b). Barra = 3 mm (a, b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Monteiro et al. (2000b) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho, quando cultivaram folhas de *P. suberosa in vitro* em meio de cultura MS. Os explantes foram mantidos em meio de indução no escuro, a $26\pm 2^\circ\text{C}$ durante quatro semanas e, após esse período, houve a formação de calos que apresentaram aspecto organogênico. Após sua transferência para meio MSM contendo 2,89 μ M de GA₃, sob condições de luz, os autores observaram a formação de gemas a partir dos calos. Já de acordo com Lombardi (2003), explantes de *P. cincinnata* Mast. cultivados em meio MS acrescido de 5% de

água de coco e mantidos em sala de crescimento, sob condições de fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, formaram gemas, via indireta, nas extremidades dos explantes, aos 14, 28 e 56 dias de cultivo.

A adição ou não de água de coco ao meio de cultura diferiu estatisticamente na indução de calos. Melhores resultados foram observados na presença de água de coco, com escore de 0,72, contrastando com 0,28 na ausência de água de coco (Figura 7).

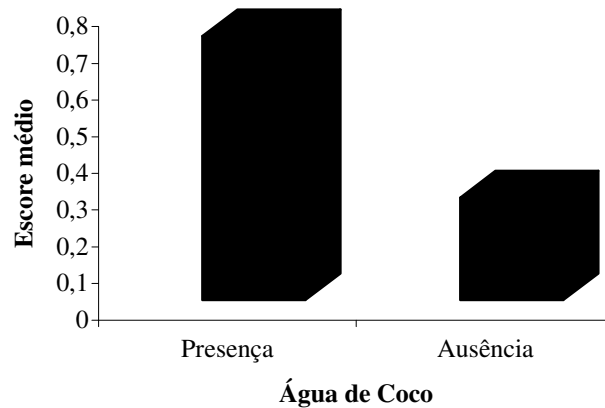


FIGURA 7. Indução de calos em segmentos foliares de *P. gibertii* na presença e na ausência de água de coco em meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais e suplementado com BAP ($8,88 \mu\text{M}$), aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Após transferência dos calos para novo meio de cultura, calos provenientes do meio contendo água de coco promoveram a formação de gemas (Figura 8 a, b), enquanto que calos provenientes de meio sem a adição de água de coco não formaram gemas (Figura 8 c, d).

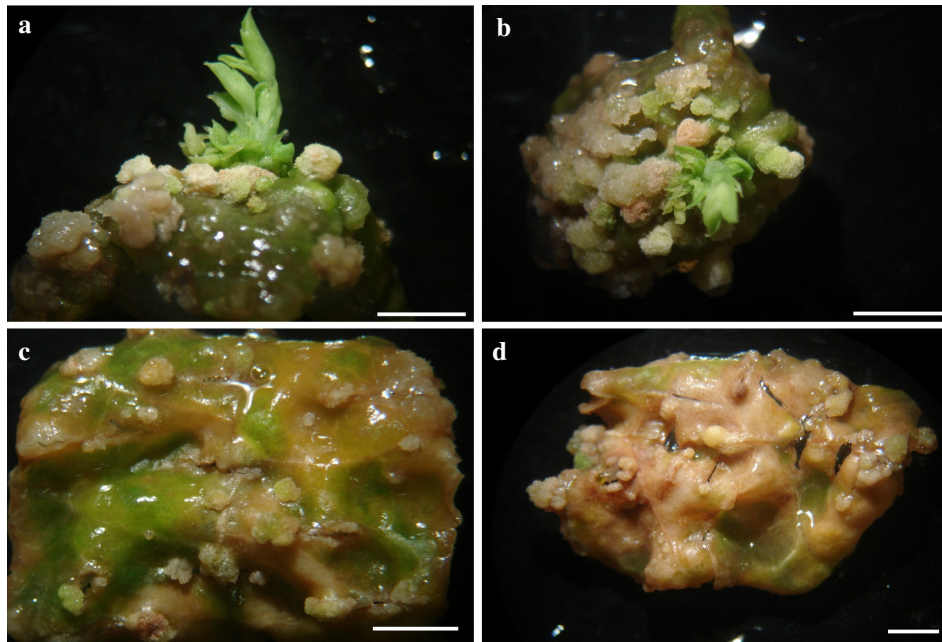


FIGURA 8. Calos organogênicos obtidos de segmentos foliares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura suplementado com água de coco (**a**, **b**); calos obtidos de segmentos foliares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura na ausência de água de coco (**c**, **d**). Barra = 3 mm (a, b, c, d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Estes resultados estão de acordo com vários autores, que enfatizam que a adição da água de coco ao meio de cultura em diferentes espécies de *Passiflora* spp. promove a organogênese (Dornelas & Vieira, 1994; Hall et al., 2000; Lombardi, 2003).

Kantharajah & Dodd (1990) verificaram que a adição de 20% de água de coco ao meio MS contendo 8,88 μM de BA elevou significativamente a produção de gemas de *P. edulis* var. Norfolk Island.

Al-Khayri et al. (1992) examinaram a influência de várias concentrações de água de coco na indução de calos a partir de discos foliares e na regeneração de gemas de espinafre (*Spinacia oleracea* L.). Os autores constataram que a

adição de 15% de água de coco ao meio de cultura aumentou o crescimento do calo, o potencial regenerativo e o crescimento das gemas.

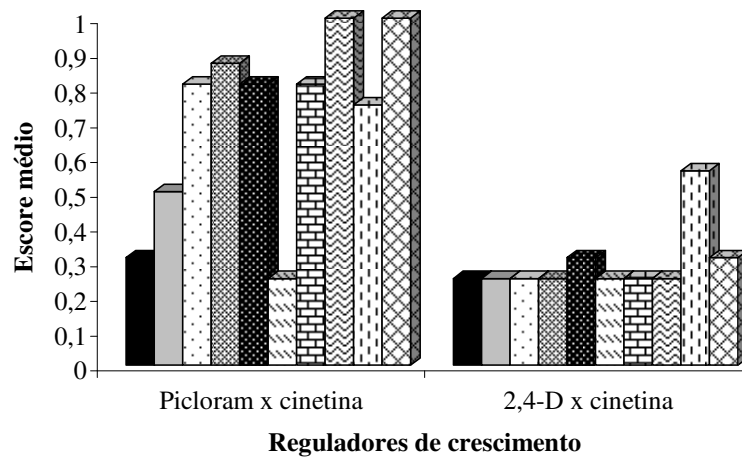
De acordo com Fernando (2005), segmentos de hipocótilo de *P. edulis* f. *flavicarpa* inoculados em meio MS contendo 5% de água de coco apresentaram maior número de gemas e protuberâncias. Contudo, independentemente da adição de água de coco, a organogênese *in vitro* foi similar, ou seja, houve formação de protuberâncias e gemas em ambas as condições de cultivo *in vitro*. Portanto, a adição de água de coco ao meio de cultura é vantajosa para a micropropagação, uma vez que o número de gemas formado é significativamente superior e morfológicamente similar, em ambos os tratamentos.

3.3 Indução de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares cotiledonares de *Passiflora gibertii*

Os diferentes reguladores de crescimento e suas concentrações diferiram estatisticamente na indução de calos.

Pela Figura 9, observa-se que, de maneira geral, a presença de picloram e cinetina no meio de cultura proporcionou maior formação de calos que a utilização de 2,4-D e cinetina.

Melhores resultados para calogênese a partir de segmentos foliares cotiledonares foram observados com a utilização de 4,14 e 8,28 μM de picloram combinado com 0,46 μM de cinetina, com escore médio de 1. Piores resultados de indução de calos (0,31 e 0,25) foram obtidos na ausência de picloram, independente de cinetina. O regulador 2,4-D obteve uma pequena formação de calos, com maior escore de 0,56, na concentração de 6,79 μM , combinada com 0,46 μM de cinetina.



- Picloram 0 µM x cinetina 0 µM ; 2,4-D 0 µM x cinetina 0 µM
- ▒ Picloram 2,07 µM x cinetina 0 µM ; 2,4-D 2,26 µM x cinetina 0 µM
- ▓ Picloram 4,14 µM x cinetina 0 µM ; 2,4-D 4,52 µM x cinetina 0 µM
- ▒ Picloram 6,21 µM x cinetina 0 µM ; 2,4-D 6,79 µM x cinetina 0 µM
- ▓ Picloram 8,28 µM x cinetina 0 µM ; 2,4-D 9,05 µM x cinetina 0 µM
- ▒ Picloram 0 µM x cinetina 0,46 µM ; 2,4-D 0 µM x cinetina 0,46 µM
- ▓ Picloram 2,07 µM x cinetina 0,46 µM ; 2,4-D 2,26 µM x cinetina 0,46 µM
- ▒ Picloram 4,14 µM x cinetina 0,46 µM ; 2,4-D 4,52 µM x cinetina 0,46 µM
- ▓ Picloram 6,21 µM x cinetina 0,46 µM ; 2,4-D 6,79 µM x cinetina 0,46 µM
- ▒ Picloram 8,28 µM x cinetina 0,46 µM ; 2,4-D 9,05 µM x cinetina 0,46 µM

FIGURA 9. Indução de calos em segmentos foliares cotiledonares de *P. gibertii* em meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais e suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

De acordo com Vietz & San-José (1996), citados por Nicioli (2006), em muitos casos, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a calogênese.

A interação entre auxinas e citocininas é, muita das vezes, responsável pela alta indução de calos. Em *Rudgea jasminoides*, Stella & Braga (2002) verificaram que a maior ocorrência de calos foi observada em meio MS suplementado com 2,22 µM de cinetina, associado a 2,07 µM de picloram.

Rosal (2004) utilizou segmentos foliares jovens, oriundos de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro* e *seedlings*, como explantes, em um trabalho de indução de calos em candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish). A autora estudou o efeito de picloram e 2,4-D, em combinação ou não com as citocininas BAP e cinetina e chegou à conclusão de que o picloram, em geral, apresenta melhores respostas para a formação de calos, em comparação ao 2,4-D. Resultados semelhantes foram obtidos por Figueiredo et al. (2000), que estudaram diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos em explantes foliares de *Rollinia mucosa*. Os autores concluíram que o meio acrescido de picloram foi o que mais induziu calos.

O presente estudo está de acordo com os autores citados, tendo o picloram, associado à cinetina, promovido maior formação de calos que 2,4-D e cinetina.

Porém, em trabalho conduzido por Flores et al. (1998), para desenvolver protocolo de calogênese em morangueiro cultivares Konvoy-Cascata e Chandler, a partir de explantes foliares, observou-se que, na cv. Konvoy-Cascata, o 2,4-D propiciou uma maior intensidade de calo. Já na cv. Chandler, o 2,4-D e o picloram não mostraram diferenças significativas quanto à intensidade de calo. Kaur & Kothari (2004) testaram a influência de 2,4-D e picloram, isolados ou em combinação com cinetina, na indução e na regeneração de calos em *Paspalum scrobiculatum* L. Estes autores demonstraram que a indução de calos embriogênicos e a subsequente embriogênese somática ocorreu em ambos os reguladores, independente de cinetina.

Dependendo da concentração de picloram utilizada, dentre outros fatores, foi observada indução de calos com diferentes colorações: translúcido (4,14 μ M picloram x 0,46 μ M cinetina); amarelo-escuro (4,14 μ M picloram x 0,46 μ M cinetina); amarelo-claro (8,28 μ M picloram x 0,46 μ M cinetina); branco (4,14 μ M picloram x 0,46 μ M cinetina); branco e marrom (6,21 μ M

picloram x 0,46 μ M cinetina); amarelo e branco (8,28 μ M picloram x 0,46 μ M cinetina) (Figura 10).

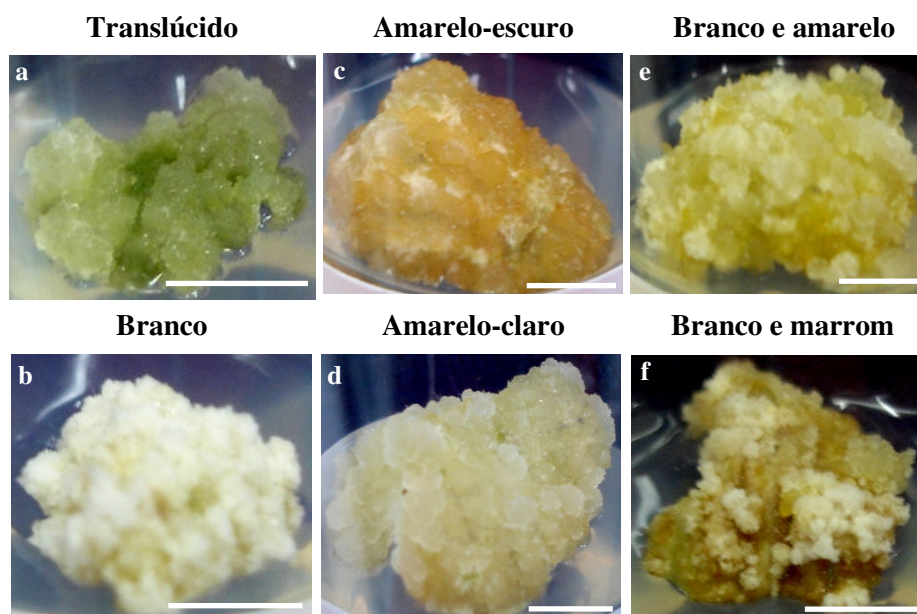


FIGURA 10. Diferentes colorações de calos obtidos em diferentes concentrações e combinações de picloram e cinetina: (a) translúcido, (b) branco, (c) amarelo-escuro, (d) amarelo-claro, (e) branco e amarelo, (f) branco e marrom. Barra = 5 mm (a, b, c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

4 CONCLUSÕES

A espécie *P. gibertii* N. E. Brown responde melhor à formação de calos que *P. edulis edulis* nativo.

A utilização de 8,88 µM de BAP promove maior percentagem de calos, a partir de segmentos foliares de maracujazeiro nativo.

Segmentos radiculares de *P. gibertii* e *P. edulis edulis* nativo, nos tratamentos utilizados, não formam calos. Não há diferença entre segmentos nodal e foliar na formação de calos de espécies de *Passiflora* nativas.

Segmentos nodal e foliar de *P. gibertii*, após transferidos para meio MSM contendo GA₃, formam gemas.

Calos oriundos de condições de escuro são mais responsivos à formação de gemas de *P. gibertii*. No intuito de reduzir os gastos na cultura *in vitro*, pode-se sugerir que o meio de indução mais indicado para organogênese de *P. gibertii* é o meio MS contendo metade da concentração de seus sais e mantido no escuro.

A adição de água de coco ao meio de cultura é essencial, tanto para indução de calos como para a formação de gemas em *P. gibertii*.

A adição de picloram e cinetina ao meio de cultura promove maior formação de calos em explantes foliares cotiledonares de *P. gibertii* que 2,4-D e cinetina. Diferentes colorações de calos, oriundos de explantes foliares cotiledonares, são observadas nos tratamentos que utilizam-se picloram e cinetina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A.; SANTOS JÚNIOR, D.; MULLER, R. C. S. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, São Paulo , v. 23, n. 3, p. 310-312, mai./jun. 2000.

AL-KHAYRI, J. M. , HUANG, F. H.; MORELOCK, T. E.; BUSHARAR, T. A. Spinach tissue culture improved with coconut water. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 4, p. 357-358, Apr. 1992.

BARBOSA, L. S. **Resistência de *Passiflora* spp. a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e detecção do patógeno em sementes**. 1995. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARDOSO, J. C. **Prêmio Banco da Amazônia de Empreendedorismo Consciente: Seleção e Aproveitamento Econômico de Espécies Vegetais Nativas da Amazônia**. Pompéia, SP. Disponível em: www.fca.unesp.br/arquivo_de_noticias/bancoamazonia.pdf. Acesso em fevereiro de 2007.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological Analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, London, v. 70, n. 5, p. 477-482, Nov. 1992.

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.

FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** 2005. 106 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares e hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica**

de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados, 4. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 192-195.

FIGUEIREDO, S. F. L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: establishment and growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, n. 2, p. 85-92, 2000.

FLORES, R.; GOMES, P. R.; FARIA, J. T. C.; CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; PETERS, J. A. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (Fragaria x ananassa) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 1, p. 9-14, jan./abr. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 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* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 48, n. 5, p. 673-680, 2000.

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.

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2, 4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 73-79, Apr. 2004.

KURODA, N. **Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Jaboticabal: FCAV-UNESP. 1981. 45 p.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, dez. 2002.

LOMBARDI, S. P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* Mast.** 2003. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium component for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, Largo, v. 36, n. 5, p. 527-531, Nov./Dec. 2000a.

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. 2000b.

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

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; FILHO, F. A. A. M. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, ago. 2001.

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.

NICOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville]**. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, J. C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 218-246.

RIBAS A. F. Estudos sobre a cultura de tecidos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 49-53, 2004.

RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M.; SIMÕES, M. O. M.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M. Organogênese *in vitro* em acessos de maracujazeiro-azedo infectados pelo vírus do endurecimento dos frutos. In: Frutas do Brasil: Saúde para o mundo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio-RJ. **Palestras e Resumos...** SBF/UENF/UFRuralRJ, 2006. p. 172.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 271-276, Mar. 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2004.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V.; WILLADINO, L.; GUERRA M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 2001. 20 p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica).

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

ZUO, J. R.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G.; CHUA, N. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 349–359, May 2002.

CAPÍTULO 4

ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ULTRA-ESTRUTURAIS DE CALOS DE MARACUJAZEIRO *Passiflora gibertii* N. E. BROWN

RESUMO

FIGUEIREDO, Milene Alves. Análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown. In: _____. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. p. 63-110. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Poucos são os estudos das alterações morfológicas e ultra-estruturais de calos organogênicos e embriogênicos, durante o seu desenvolvimento. O objetivo deste trabalho é caracterizar, morfológica e ultra-estruturalmente, a calogênese em explantes foliares de *Passiflora gibertii* N. E. Brown. Para a obtenção de calos com características organogênicas, folhas foram inoculadas em meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de BAP (8,88 μM), água de coco (5%) e sacarose (3%). Após assepsia e inoculação, explantes foliares 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 (presença de luz) e no escuro à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 30 dias. Após esse período, explantes com calos foram transferidos para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (2,22 μM), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz, por 30 dias. Folhas cotiledonares foram utilizadas para a obtenção de calos embriogênicos. Explantes (foliares) após assepsia foram inoculados em meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com sacarose (3%), 2,4-D x cinetina e picloram x cinetina. Para análises morfológicas e ultra-estruturais de diferentes colorações de calos, utilizaram-se calos, conforme coloração: translúcido, amarelo-escuro, amarelo-claro, branco, branco e marrom, branco e amarelo. Após 30 dias em meio de cultura, calos obtidos acima foram fixados em Karnovsky e preparados para a visualização

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador).

em eletromicroscopia de transmissão e varredura e microscopia de luz. Explantes foliares de *P. gibertii*, mantidos em meio de cultura MS no escuro, acrescido de BAP (8,88 μ M) e água de coco (5%) por 30 dias, induzem a formação de calos que, posteriormente, transferidos para meio MS, na presença de luz e contendo BAP (2,22 μ M), formam calos organogênicos, cujos parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, núcleo com nucléolo proeminente, presença de grãos de amido e citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático. O regulador 2,4-D proporciona a obtenção de calos com características embriogênicas (células com formato isodiamétrico, pequenas e com pequeno espaço intercelular, sistema celular organizado e predominância de mitocôndrias de formato arredondado), enquanto resultados negativos (predominância de células com formato alongado, células maiores e com espaços intercelulares, sistema celular desorganizado e predominância de mitocôndrias de formato alongado) são observados para picloram. Calos translúcidos e amarelo-claros apresentam características não-morfogênicas, como células de diferentes formatos, sistema celular desorganizado, células grandes e ausência ou pouco conteúdo de amido. Calos de coloração amarelo-escuro e branco-marrom apresentam características embriogênicas e os parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são predominância de células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, células pequenas, citoplasma denso e rico em mitocôndria e retículo endoplasmático.

**MORPHOLOGIC AND ULTRA-STRUCTURAL ANALYSES OF
Passiflora gibertii N. E. BROWN CALLUS**

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Milene Alves. Morphologic and ultra-structural analyses of *Passiflora gibertii* N. E. Brown callus. In: _____. **Production, morphologic and ultra-structural analyses of *Passiflora* spp. callus.** 2007. p.63-110. Dissertation (Master's degree in Agronomy/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

Few are the studies of the morphologic and ultra-structural alterations of embryogenic and organogenic callus, during development. The objective of this work was to characterize, morphologic and ultra-structurally, calogenesis in leaf explants of *Passiflora gibertii* N. E. Brown. To obtain callus with organogenic characteristics, leaves were inoculated in MS culture medium containing half of its salt concentration, supplemented with BAP (8,88 μM), coconut water (5%) and sucrose (3%). After asepsis and inoculation, leaf 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 (light presence) and in the dark at temperature of $25\pm 2^\circ \text{C}$, for 30 days. After this period, explants with callus were transferred to MS culture medium containing half of its salt concentration, supplemented with BAP (2,22 μM), sucrose (3%) and solidified with agar (0,5%). After inoculation, the explants were maintained in the growth room, in the presence of light, for 30 days. Cotyledonary leaves were used for the embryogenic callus formation. Explants (leaf) after asepsis were inoculated in MS culture medium containing half of its salt concentration supplemented with sucrose (3%), and the 2,4-D + kinetin and picloram + kinetin. For morphologic and ultra-structural analyses of different callus with colors, the following callus were used: translucent, dark yellow, light yellow, white, white and brown, white and yellow. After 30 days in culture medium, callus obtained above were fixed in Karnovsky and prepared for the visualization in scanning and transmission electromicroscopy and light microscopy. *P. gibertii* leaf explants inoculated in MS culture medium and maintained in the dark in the BAP (8,88 μM) and coconut water (5%) for 30 days, induce callus formation, later transferred to MS medium, in the presence of light and BAP (2,22 μM) turned organogenic, whose morphologic and ultra-structural parameters associated were of isodiametric

* Guidance Committee: Dr. Renato Paiva - UFLA (Advisor).

cells, presenting organized cellular system, nucleus with prominent nucleolar, presence of starch grains and dense cytoplasm rich in endoplasmic reticulum. The growth regulator 2,4-D provides the obtaintion of callus with embryogenic characteristics (cells with isodiametric format, small and with small intercellular space, organized cellular system and predominance of round format mitochondria), while negative results (predominance of prolonged format cells, larger cells with intercellular spaces, disorganized cellular system and predominance of prolonged format mitochondria) are observed when picloram is used. Translucent and yellow-clear callus present no-morfogenic characteristics, like cells of different formats, disorganized cellular system, larger cells and absence or reduced starch content. Callus of yellow-darkness and white-brown coloration presented embryogenic characteristics with the following morphologic and ultra-structural parameters: predominance of isodiametric format cells, organized cellular system, small cells, dense cytoplasm rich in mitochondria and endoplasmic reticulum.

1 INTRODUÇÃO

A cultura de células e tecidos *in vitro* inclui a organogênese e a embriogênese somática (Christianson & Warnick, 1988). A habilidade para a regeneração de planta depende do tipo de explante (Mathews, 1987), da sua idade, do grau de diferenciação (Fiore et al., 1997; Santos et al., 1994), do seu tamanho e de como é implantado no meio (Özcan et al., 1993; Tomar & Gupta, 1988).

Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos histológicos podem ser realizados para verificação e confirmação da via de regeneração, diferenciando-se organogênese de embriogênese somática. Caracterizando-se a via de regeneração, podem-se estabelecer melhores condições de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes para a indução e a obtenção de plantas. Cortes histológicos seriados, 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 alterações celulares e a atividade de organelas durante os processos, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos (Monteiro-Hara, 2000).

Células embriogênicas, independente do padrão direto ou indireto, apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embriogênicas ativas, incluindo rápida divisão mitótica, tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolos proeminente, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. Essas características podem ser analisadas por meio de estudos ultra-estruturais e sugerem uma intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica (Williams & Maheswaran, 1986).

No caso de calos organogênicos, poucos são os relatos encontrados na literatura que os caracterizam citologicamente durante seu desenvolvimento. Torna-se, então, necessário o estudo das alterações morfológicas e ultra-estruturais durante a organogênese *in vitro*, visando à formação de mudas de maracujazeiro.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, morfológica e ultra-estruturalmente, a calogênese em explantes foliares de *Passiflora gibertii*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e procedimentos laboratoriais do cultivo *in vitro*

Plantas matrizes jovens de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown - acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), Planaltina, DF, foram mantidas em sala de crescimento, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons $43\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. As idades das plantas foram de 52 e 45 dias, para os experimentos de organogênese e embriogênese somática, respectivamente.

Para desinfestação, em câmara de fluxo laminar, folhas de maracujazeiro foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 0,5% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito), por 10 minutos e, posteriormente, lavadas 3 vezes, em água destilada e autoclavada.

Após assepsia, as folhas foram excisadas em diâmetros de $\approx 1\ \text{cm}^2$ e estimuladas a formar calos, efetuando-se pequenos cortes na face abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura.

2.2 Organogênese

Para a obtenção de calos com características organogênicas, folhas foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de BAP (8,88 μM), água de coco (5%) e sacarose (3%). Após inoculados, 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 (presença de luz) e no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias (Figura 1). Os calos utilizados no presente experimento referem-se aos resultantes do primeiro experimento, do item 3.2, Capítulo 3.

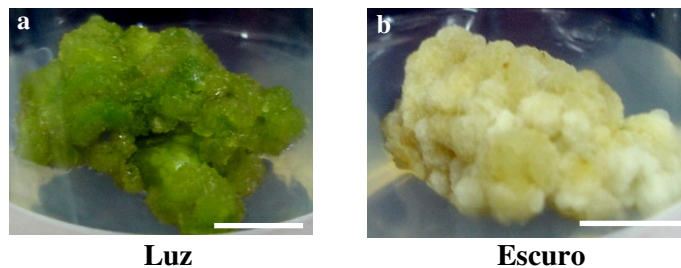


FIGURA 1. Calos cultivados em meio contendo BAP e mantidos na presença de luz (a) e no escuro (b). Barra = 5 mm (a, b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Após esse período, explantes com calos, obtidos no meio citado acima, foram transferidos para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP (2,22 μM), sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculação, os 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 30 dias.

2.3 Embriogênese somática

Folhas cotiledonares foram utilizadas para a obtenção de calos embriogênicos. Estas folhas foram inoculadas conforme metodologia utilizada no experimento 2.3, do capítulo 3. Após inoculados, explantes foram mantidos no escuro, à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 dias.

Utilizaram-se, para análises morfológicas e ultra-estruturais, calos oriundos dos tratamentos 2,4-D ($6,79\ \mu\text{M}$) x cinetina ($0,46\ \mu\text{M}$) e picloram ($6,21\ \mu\text{M}$) x cinetina ($0,46\ \mu\text{M}$) (Figura 2), resultantes do experimento 3.3, do capítulo 3.

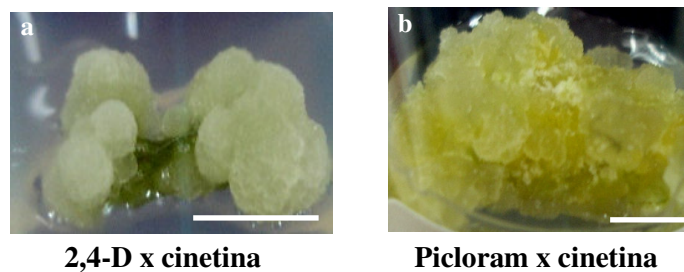


FIGURA 2. Calos cultivados em meio contendo 2,4-D e cinetina (a) e picloram e cinetina (b). Barra = 5 mm (a, b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para as análises morfológica e ultra-estrutural de calos apresentando diferentes colorações, utilizaram-se calos conforme coloração obtida no experimento 3.3, do capítulo 3: translúcido ($4,14\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina); amarelo-escuro ($4,14\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina); amarelo-claro ($8,28\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina); branco ($4,14\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina); branco e marrom ($6,21\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina); amarelo e branco ($8,28\ \mu\text{M}$ picloram x $0,46\ \mu\text{M}$ cinetina) (Figura 3).

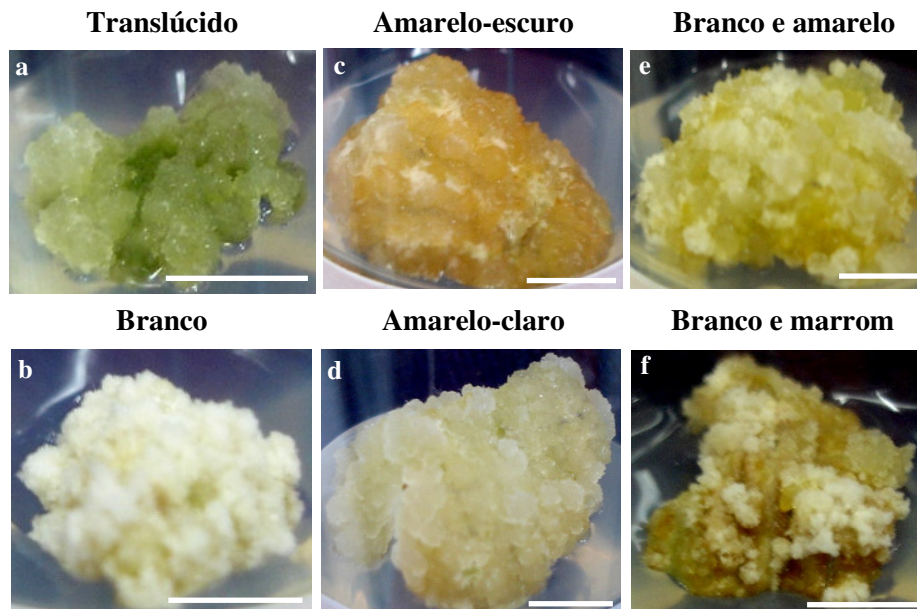


FIGURA 3. Diferentes colorações de calos: (a) translúcido, (b) branco, (c) amarelo-escuro, (d) amarelo-claro, (e) branco e amarelo, (f) branco e marrom. Barra = 5 mm (a, b, c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Calos obtidos dos experimentos citados nos itens 2.2 e 2.3 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, os calos foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05 M, 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.

Em seguida, os blocos obtidos foram submetidos ao desbaste com lâminas de barbear para a retirada da resina excedente e realizados os cortes em seções semifinas (1 μm) e ultrafinas (<100nm), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung (ultracut), com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro e colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina (1 g azul de toluidina, 1 g borato de sódio e 100 mL de água purificados em filtro Millipore 0,2 μm) e montados, permanentemente, em meio Permoult.

Os cortes ultrafinos foram coletados em uma gota de água com grades Slots e colocados em raques, cobertos com película de formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 902 a 80Kv.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Calos, obtidos dos experimentos citados nos itens 2.2 e 2.3 deste capítulo, foram fixados em Karnovsky modificado por um período de, pelo menos, 24 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas.

Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente 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 20 kV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Organogênese

Foram observadas diferenças morfológicas e ultra-estruturais entre as células dos diferentes calos estudados.

Calos cultivados em meio contendo BAP e mantidos na presença de luz (Figura 1a) apresentaram células tanto com formato isodiamétrico (Figura 4 a, c), como alongado (Figura 4 b, d).

Na superfície dos calos cultivados em meio contendo BAP e mantidos na ausência de luz (Figura 1b) observou-se proliferação de células bem organizadas de formato isodiamétrico (Figura 5).

Estudos utilizando a microscopia de luz (ML) e MET demonstraram que as células estão em divisão, com sistema celular organizado, em diferentes formatos e estágio de divisão, tanto para calos cultivados na presença de luz (Figura 6 a;b) como na sua ausência (Figura 7 a;b). Outras características celulares em comum dos calos cultivados na presença e ausência de luz são: núcleo com nucléolo proeminente (Figuras 6 e 7 c), vacúolo granular (Figuras 6 d, f; 7 c;d), citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático (Figuras 6 c;f; 7 f), grãos de amido (Figuras 6 c;f; 7 c;d), corpos lipídicos (Figuras 6 d, f; 7 f) e prováveis compostos fenólicos (Figuras 6 a;b; 7 a;b, e). Observações celulares

dos calos cultivados na presença de luz apresentaram, ainda, citoplasma rico em mitocôndrias e cloroplastos imaturos (Figura 6 c;f).

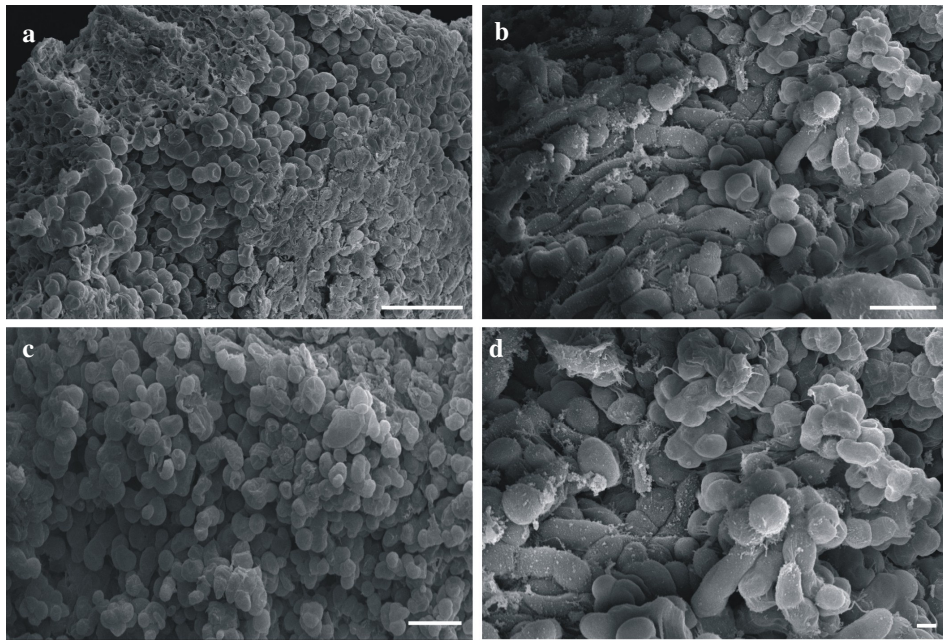


FIGURA 4. Eletromicrografias de varredura de calos de folhas de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, e mantidos na presença de luz. Barras = 200 μm (a), 100 μm (b, c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Dornellas et al. (1992) observaram a resposta de tecidos embriogênicos de *Stylosanthes scabra*, detectando a alta dependência do tipo de regulador de crescimento utilizado. Os autores ainda observaram a organogênese obtida pela utilização de BAP, porém, a indução de embriogênese somática foi a partir do regulador 2,4-D.

A constituição bioquímica do gênero *Passiflora* advém das espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata*, porém, tais estudos fitoquímicos são escassos

para esse gênero (Costa & Tupinambá, 2005). Os grupos químicos relatados com maior frequência pelos autores são alcalóides indólicos, flavonóides, esteróis, lignanos e cianoglicosídeos. Como há descrição de ocorrência de fenóis para o gênero e os taninos são polifenóis, há a possibilidade de que tal metabólito esteja presente na espécie em questão, pois, foi verificado na fotomicrografia e eletromicrografia de transmissão, provável depósito de compostos fenólicos, como os taninos (Figuras 6 a;b; 7 a;b, e). Estes são encontrados, principalmente, nos vacúolos das plantas e, nestes locais, não interferem no metabolismo celular. Somente após lesão ou morte celular eles agem e têm metabolismo eficiente (Prance & Prance, 1993, citados por Nicioli, 2006).

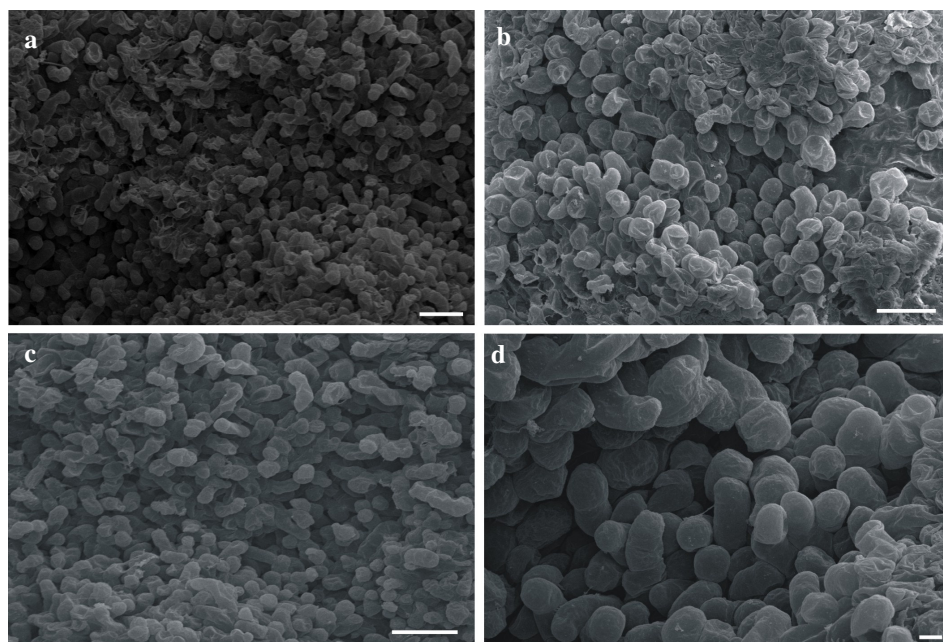


FIGURA 5. Eletromicrografias de varredura de calos de folhas de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, e mantidos na ausência de luz. Barras = 100 μ m (a, b, c), 20 μ m (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

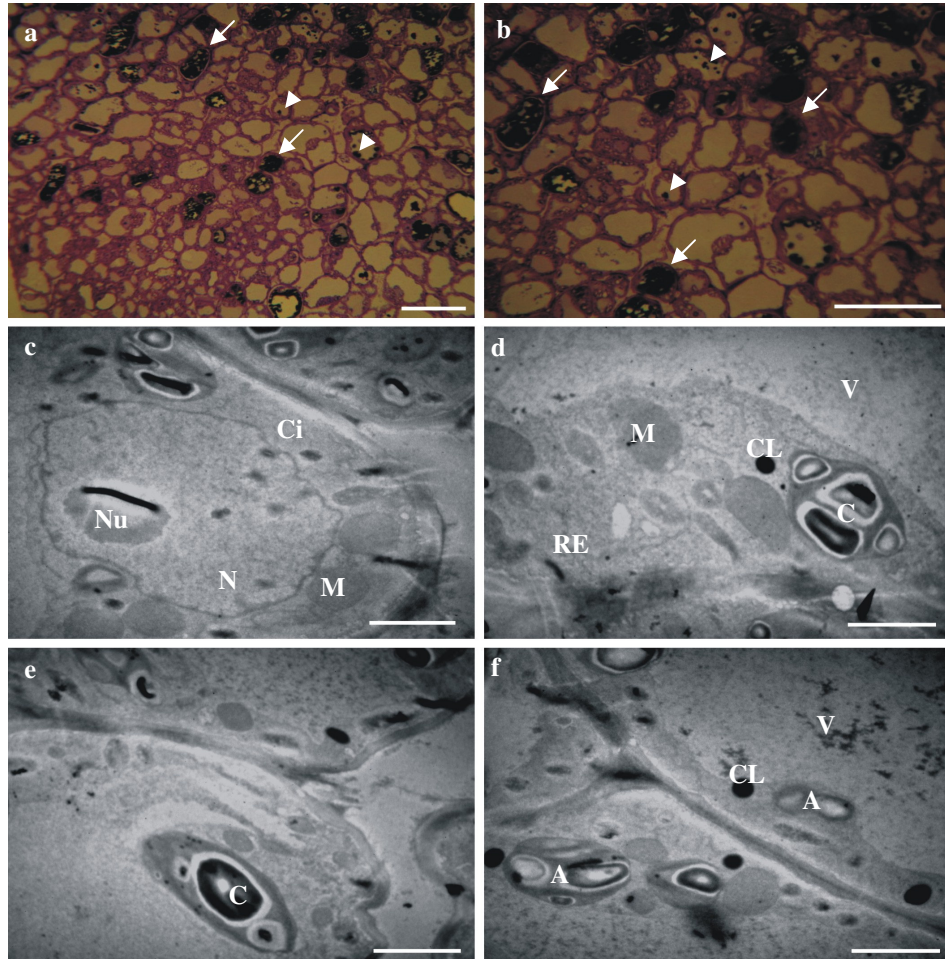


FIGURA 6. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos em folhas de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, e mantidos na presença de luz. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, CL = corpos lipídicos, A = amido, N = núcleo, Nu = nucléolo, C = cloroplasto. Em a e b, células com acúmulo de compostos fenólicos = setas, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μ m (a, b), 2 μ m (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

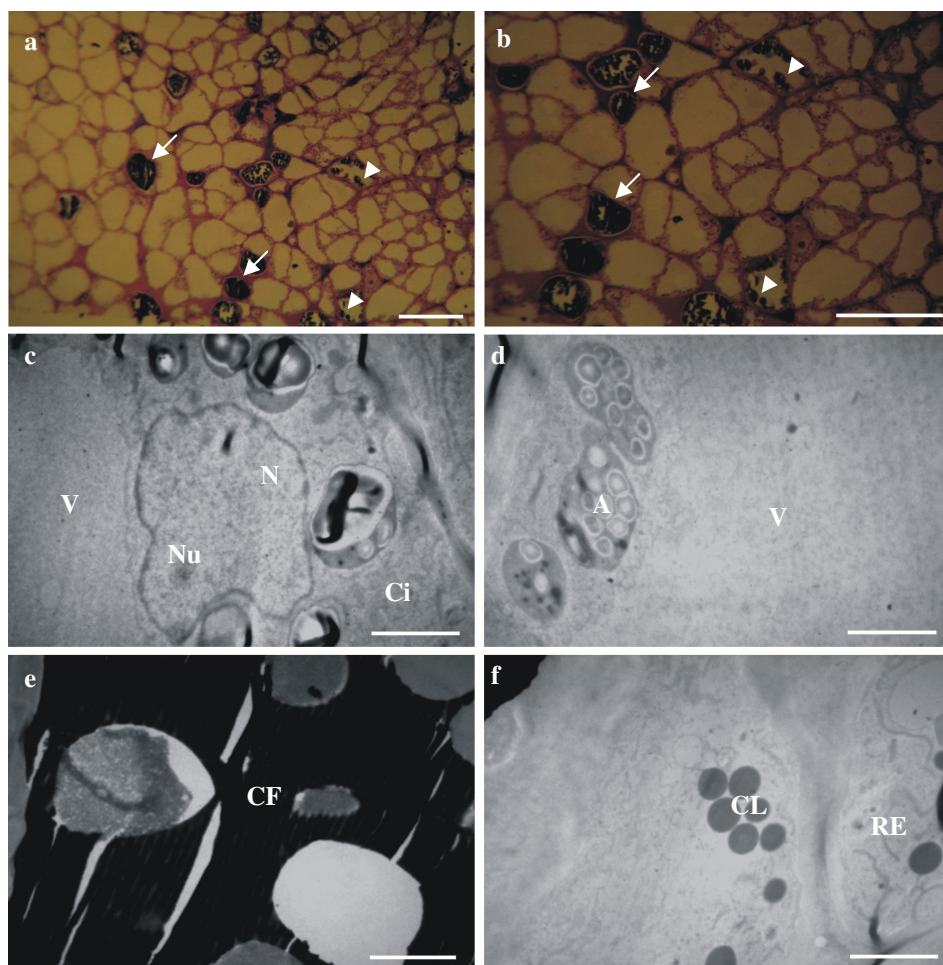


FIGURA 7. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos em folhas de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, e mantidos na ausência de luz. RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, CL = corpos lipídicos, A = amido, N = núcleo, Nu = nucléolo, compostos fenólicos = CF. Em a e b, células com acúmulo de compostos fenólicos = setas, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Características ultra-estruturais de células envolvidas na organogênese *in vitro* de *Bauhinia forficata* (via indireta) e *Glycine max* (via direta) foram estudadas. Retículo endoplasmático rugoso (RER) arranjado concentricamente, grandes vacúolos e plastídeos contendo grãos de amido foram observados durante a organogênese de *Glycine max* (L.) Merrill e *Bauhinia forficata* Link. A presença de plastídeos ao redor do núcleo e de envelope nuclear com poros conspícuos foi observada apenas em *B. forficata* (Apezzato-da-Glória & Machado, 2004). Os meristemóides de *Bauhinia forficata* e *Glycine max* não tiveram origem a partir de células meristemóides típicas, mas, sim, de células altamente vacuolizadas, de acordo com os autores supracitados. Estes resultados são também observados no presente trabalho, no qual as células com potencial organogênico apresentaram-se altamente vacuolizadas, com citoplasma rico em organelas e presença de grãos de amido (Figuras 6 e 7; Tabela 1).

TABELA 1. Características de células com potencial organogênico, dos calos obtidos de folhas de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, mantidos na presença e ausência de luz aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

BAP Luz	BAP Escuro
Células com formato isodiamétrico e alongado	Predominância de células com formato isodiamétrico
Sistema celular organizado	Sistema celular organizado
Núcleo com nucléolo proeminente	Núcleo com nucléolo proeminente
Presença de grãos de amido	Presença de grãos de amido
Prováveis taninos	Prováveis taninos
Citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático	Citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático

Após sete dias da transferência dos calos cultivados no escuro para meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de BAP (2,22 μ M) e mantidos em sala de crescimento na presença de luz, estes

tornaram-se organogênicos (Figura 8), formando gemas e primórdios foliares (Figura 9).

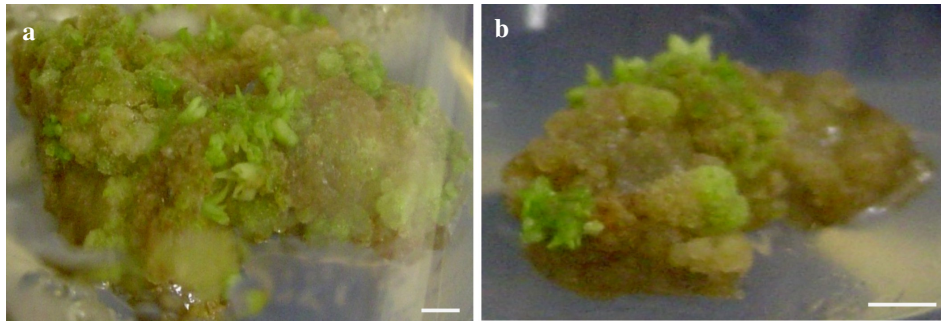


FIGURA 8. Calos organogênicos obtidos de folhas de *P. gibertii* cultivadas em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, mantidos na ausência de luz e após sete dias de transferência para novo meio na presença de luz. Barra = 2 mm (a, b). UFLA, Lavras, MG, 2007.

De acordo com Appezzato-da-Glória et al. (2005), em *Passiflora*, é freqüente a formação de estruturas foliares, as quais são erroneamente interpretadas como gemas que não se alongam. As análises estruturais da organogênese *in vitro* em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e em *P. cincinnata* Mast. têm mostrado grande determinação dos explantes para a formação de primórdios foliares. Os autores citados acima afirmam que esse caminho organogênico compromete o sucesso da cultura *in vitro*, pois a presença de meristema apical caulinar é essencial para a produção de brotos.

As observações em MEV permitiram a diferenciação morfológica entre gemas caulinares e estruturas foliares isoladas, baseando-se no fato de que, nestas, a base se insere diretamente no explante (Figura 9 b-f), enquanto nas gemas, os primórdios foliares saem de um eixo comum (Figura 9 a).

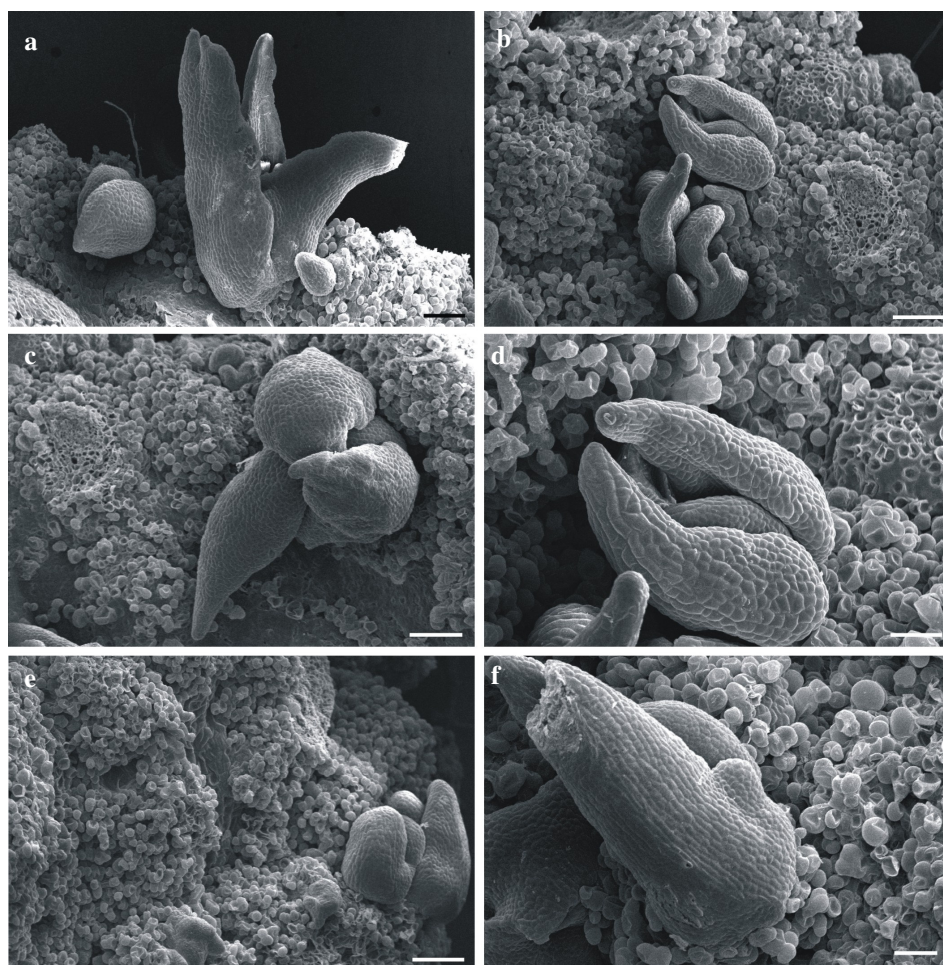


FIGURA 9. Eletromicrografias de varredura de calos organogênicos obtidos de folhas de *P. gibertii* cultivadas em meio de cultura MS, contendo metade da concentração de seus sais e BAP, mantidos na ausência de luz e após sete dias de transferência para novo meio na presença de luz. (a) gema; (b-f) primórdios foliares. Barras = 200 μ m (a, b, c, e), 100 μ m (d, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Confirmando a importância do presente trabalho, Appezzato-da-Glória et al. (2005) citam que as observações ao microscópio eletrônico de varredura das estruturas originadas *in vitro* são fundamentais e constituem maneira rápida de

caracterização morfológica, permitindo a distinção entre gemas e primórdios foliares.

3.2 Embriogênese somática

Quanto à indução de caráter embriogênico, observações em MEV mostraram que a proliferação de células dos calos cultivados em meio contendo 2,4-D e cinetina (Figura 2a) apresentaram-se bem organizadas, com formato isodiamétrico (Figura 10).

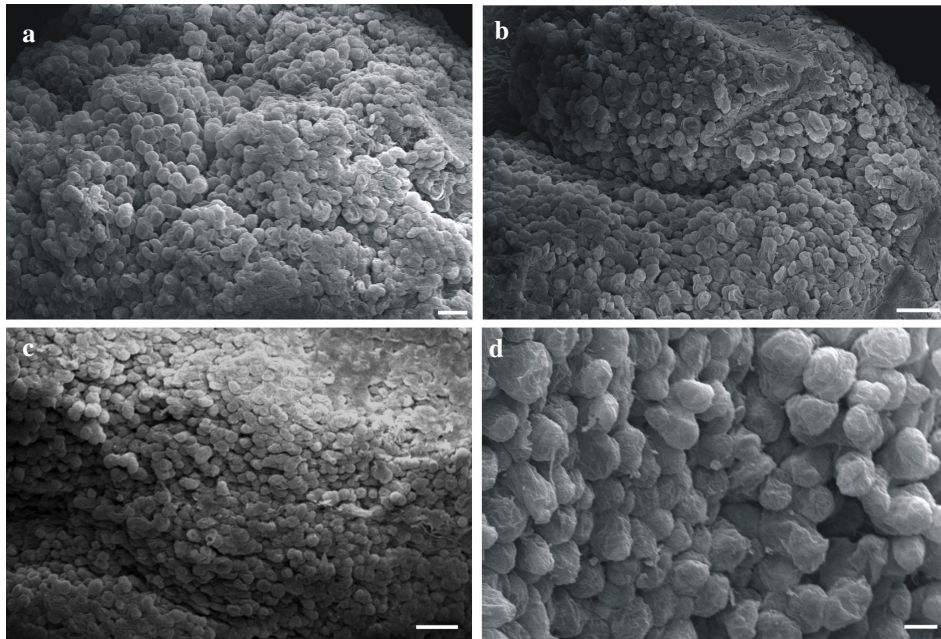


FIGURA 10. Eletromicrografias de varredura de calos de folhas cotiledonares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura na presença de 2,4-D e cinetina, evidenciando células isodiamétricas (a-d). Barras = 100 µm (a, b, c), 20 µm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

No entanto, na superfície dos calos cultivados em meio contendo picloram e cinetina (Figura 2b), foram verificadas, principalmente, formas alongadas (Figura 11).

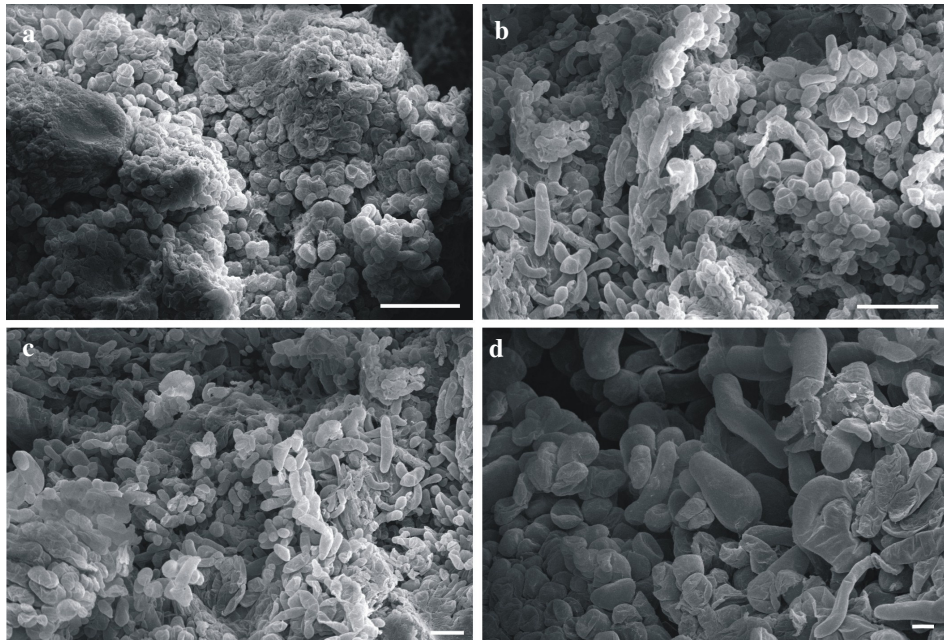


FIGURA 11. Eletromicrografias de varredura de calos de folhas cotiledonares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura na presença de picloram e cinetina evidenciando, na sua maioria, células alongadas (b-d) e algumas formas isodiamétricas. Barras = 200 μm (a, b), 100 μm (c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Observações, em MET, dos calos cultivados na presença de 2,4-D e cinetina, mostraram que as células são pequenas e bem dispostas (Figura 12 a;b), com pequeno espaço intercelular (Figura 12 e). Seu citoplasma denso é abundante, tanto em mitocôndrias, de formato alongado (Figura 12 d) e arredondado com cristas bem desenvolvidas (Figura 12 f), como em retículo

endoplasmático (Figura 12 c-f). As células apresentaram vacúolo grande e central, além de alguns pequenos e dispersos no citoplasma (Figura 12 c). Pôde-se observar também a presença de corpos lipídicos (Figura 12 c,e,f), grãos de amido (Figura 12 a;b) e provável acúmulo de compostos fenólicos (Figura 12 a;b).

Já as células dos calos cultivados na presença de picloram e cinetina são maiores, com espaços intercelulares e de formato irregular (Figura 13 a;b). Seu citoplasma, de forma semelhante ao anterior, contém muitas organelas, como mitocôndrias de formato alongado (Figura 13 c), retículo endoplasmático (Figura 13 d;e) e grãos de amido (Figura 13 e). As células apresentaram um grande vacúolo, prováveis vesículas de secreção (Figura 13 f) e corpos lipídicos (Figura 13 c), porém, não foi observado acúmulo de compostos fenólicos.

Canhoto et al. (1996) afirmam que as células podem se tornar competentes para embriogênese somática, desde que a interação entre fatores endógenos e exógenos, como a concentração e o tipo de regulador de crescimento utilizado, esteja balanceada, desencadeando uma série de eventos moleculares que podem afetar a expressão do gene e determinar a diferenciação de embriões somáticos.

Células da camada meristemática não envolvidas na diferenciação do embrião somático são altamente vacuolizadas, apresentando mitocôndria extremamente alongada e organelas com inclusões cristalinas (Canhoto et al., 1996).

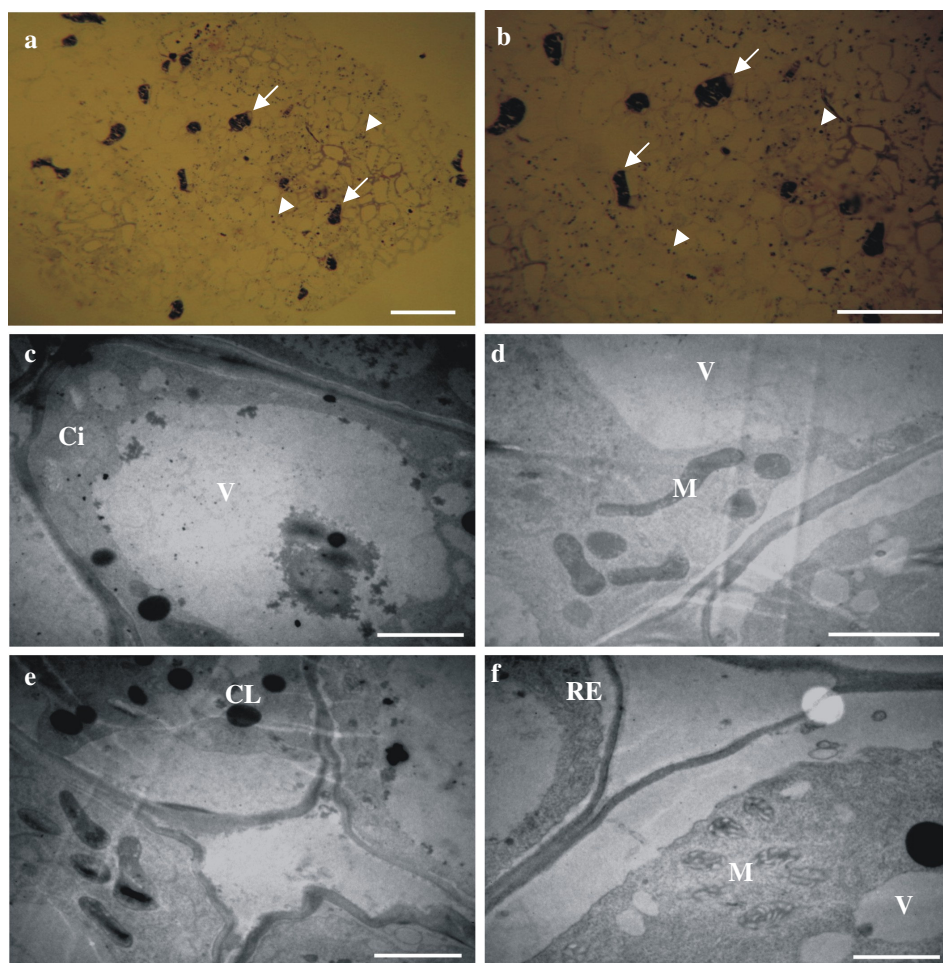


FIGURA 12. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos em folhas cotiledonares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura na presença de 2,4-D e cinetina. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, CL = corpos lipídicos. Em a e b, células com acúmulo de compostos fenólicos = setas, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c, d, e), 1 μm (f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

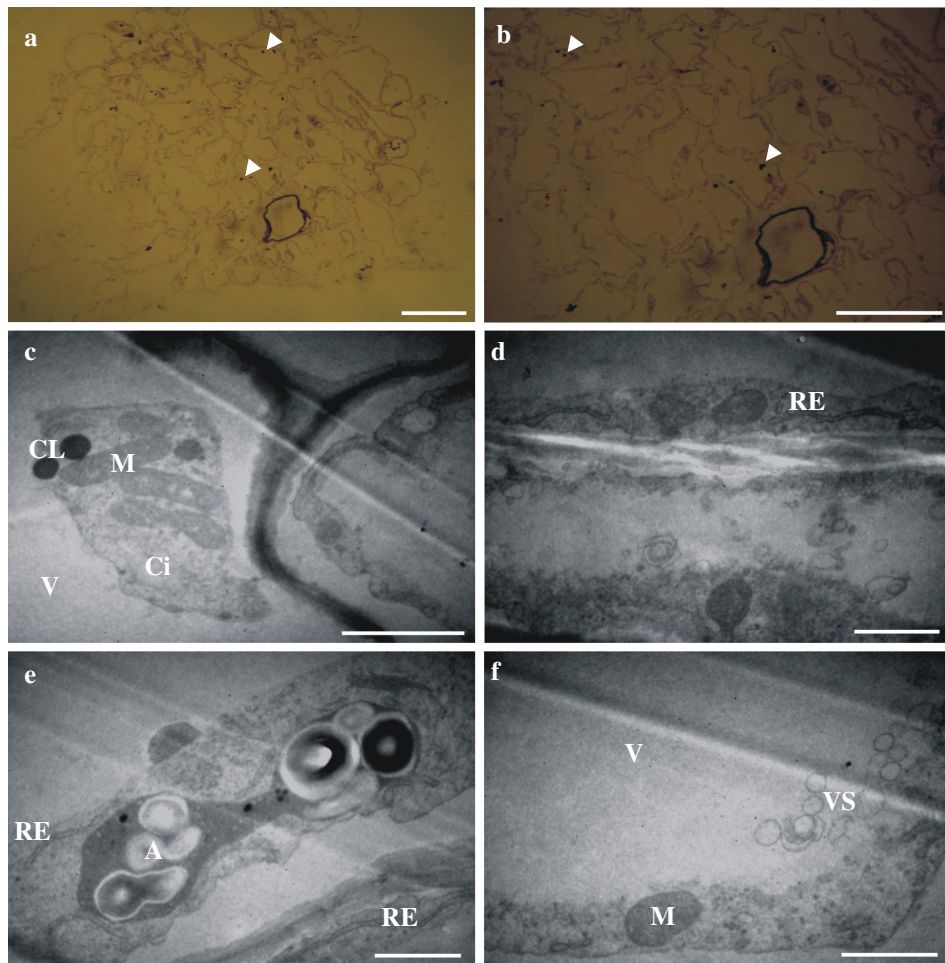


FIGURA 13. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos em folhas cotiledonares de *P. gibertii* cultivados em meio de cultura na presença de picloram e cinetina. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, CL = corpos lipídicos, VS = vesículas secretoras, A = amido, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c), 1 μm (d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Mitocôndrias de células embriogênicas são abundantes, usualmente ovais ou arredondadas e apresentam uma matriz eletrodensa com a crista bem

desenvolvida (Appezzato-da-Glória & Machado, 2004; Canhoto et al., 1996), como as observadas no presente trabalho em células de calos cultivados em meio contendo 2,4-D. Esse fator está relacionado à alta atividade metabólica, pelas altas taxas respiratórias. Células não embriogênicas são caracterizadas pela presença de mitocôndria alongada (Canhoto et al., 1996) que também foi observada no atual estudo, porém, em células de calos cultivados na presença de picloram.

Em Nuti Ronchi & Giorgetti (1995), vários autores afirmam que células com largo vacúolo em cultura de suspensão de cenoura e alfafa não são embriogênicas. Muitos autores concordam que células pequenas, com citoplasma denso e rápida divisão celular, são a unidade primária do desenvolvimento de embriões somáticos, sendo sempre precedidos pela formação de um pequeno grupo de células.

Zuo et al. (2002) citam o 2,4-D exercendo a função de indutor da embriogênese somática. Em estudos com *Phyllostachys bambusoides*, Komatsu (1995) observou que o picloram possibilitou a obtenção de calos brancos friáveis e amarelos globulares, mas foi na ausência desse regulador que o autor observou a formação de raízes, centros meristemáticos e embriões somáticos a partir do calo amarelo globular.

De acordo com Dornelas et al. (1992), a atividade meristemática induzida por 2,4-D em cotilédones imaturos de *Stylosanthes scabra* conduziu para o desenvolvimento de estruturas globulares que vieram, aparentemente, de divisões que produziram células pequenas, com núcleo grande, citoplasma denso e promoveram rápida expansão do explante cotiledonar. Com o desenvolvimento da cultura, as estruturas globulares originaram embriões somáticos. Nenhuma conexão vascular foi observada, evidenciando a embriogênese somática direta.

Células envolvidas na formação do embrião somático contêm um grande núcleo com nucléolos proeminentes e citoplasma denso com numerosos

ribossomos, mitocôndria, plastídeos com amido e poucas seções de retículo endoplasmático rugoso. Células não envolvidas na diferenciação do embrião somático foram caracterizadas pela presença de várias organelas contendo mitocôndria alongada (Canhoto et al., 1996).

Quando Marbach (1998) observou o efeito de concentrações de ANA e picloram na calogênese e na embriogênese somática a partir de explantes foliares de berinjela (*Solanum melongena* L.), ambos os reguladores induziram calos nos explantes foliares, mas apenas ANA induziu embriogênese somática. O autor supracitado concluiu que tais resultados indicam que a calogênese e a embriogênese somática são eventos biológicos independentes, pois a embriogênese somática pode ser direta e indireta.

Os resultados obtidos no atual estudo confirmaram que, para a obtenção de calos com características embriogênicas, o regulador 2,4-D foi superior aos resultados observados com o picloram (Tabela 2), corroborando com os resultados obtidos por Dornelas et al. (1992).

TABELA 2. Características de células embriogênicas (2,4-D x cinetina) e não-embriogênicas (picloram x cinetina) dos calos obtidos de folhas cotiledonares de *P. gibertii*, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

2,4-D x cinetina	Picloram x cinetina
Células com formato isodiamétrico, pequenas e com pequeno espaço intercelular	Predominância de células com formato alongado, células maiores e com espaços intercelulares
Sistema celular organizado	Sistema celular desorganizado
Predominância de mitocôndrias de formato arredondado	Predominância de mitocôndrias de formato alongado

Com relação ao padrão de coloração, a análise em MEV dos calos translúcidos (Figura 3 a) mostrou que as células apresentaram-se pouco

organizadas, com formato isodiamétrico e alongadas (Figura 14 a, c, d). No entanto, na Figura 14 b observam-se também células em formato oblongo.

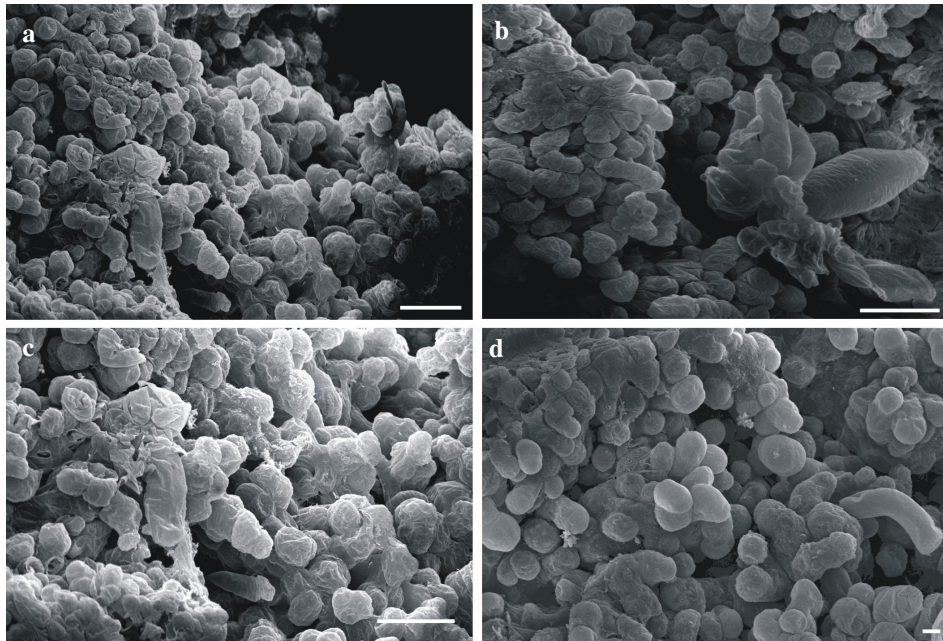


FIGURA 14. Eletromicrografias de varredura de calos translúcidos de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b, c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Células pouco organizadas são também observadas na Figura 15 (a-d), porém, ocorre predomínio de células alongadas, nos calos de coloração amarelo-clara (Figura 3 d).

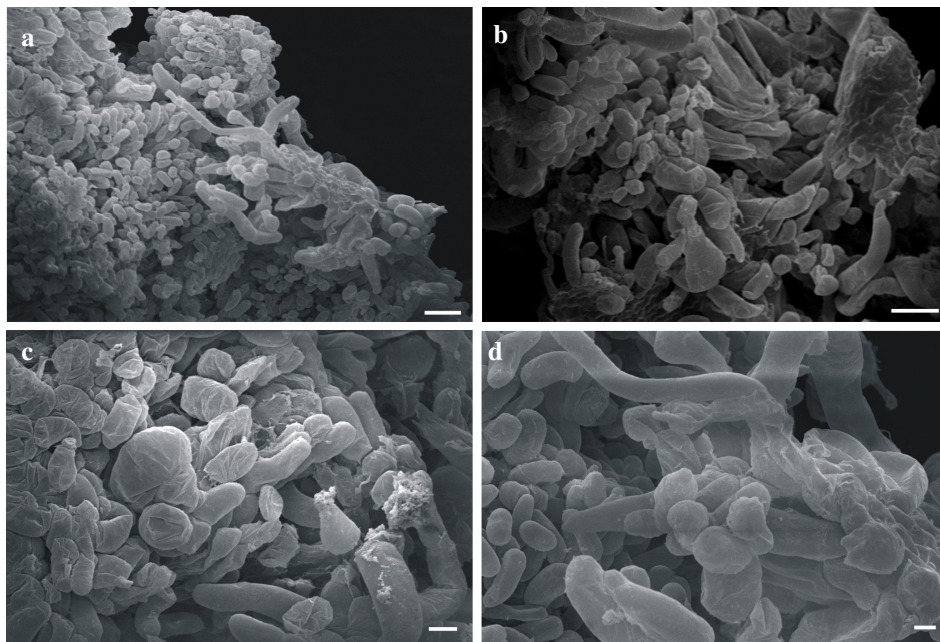


FIGURA 15. Eletromicrografias de varredura de calos de coloração amarelo-clara de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b), 30 μm (c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Conforme se observa na Figura 16 (a,b), as células dos calos translúcidos são grandes e com poucos espaços intercelulares, apresentam citoplasma estreito (Figura 16 c), rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático (Figura 16 c-f). Na Figura 16 d observa-se, ainda, grande vacúolo e, de modo geral, as células são de parede fina e sem grãos de amido detectáveis.

De forma antagônica ao presente trabalho, El Maâtaoui et al. (1990) observaram que células de calos friáveis e translúcidos apresentaram citoplasma denso, rico em grãos de amido, núcleo volumoso posicionado centralmente com muitos nucléolos e vacúolos que ocorreram em duas diferentes formas morfológicas, globulares ou alongadas com contornos sinuosos. Observaram,

ainda, que esses calos foram embriogênicos e apresentavam nódulos esféricos com tamanhos variáveis.

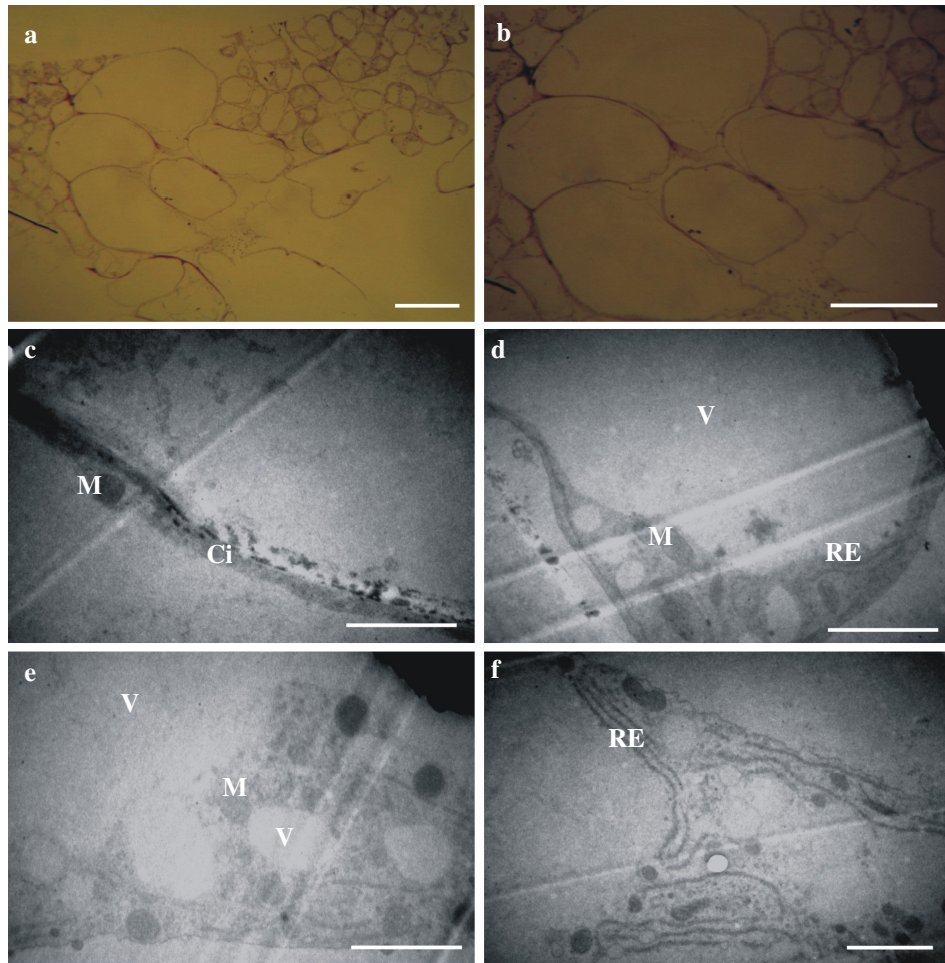


FIGURA 16. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos translúcidos de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo. Barras = 50 µm (a, b), 2 µm (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Quando se observam calos de coloração amarelo-clara, nota-se que as células são grandes e com espaços intercelulares proeminentes (Figura 17 a,b). Observando-se a Figura 17 c-f, constata-se que as mesmas apresentam pouco conteúdo celular, com citoplasma estreito, conforme observado também na Figura 15c, com mitocôndrias e retículo endoplasmático (Figura 17 c-f), com vacúolo grande (Figura 17 c-d). Embora as células tenham citoplasma estreito, estas apresentam parede espessa (Figura 17 e, f), com pouco conteúdo de amido (Figura 17 e).

Tanto calos translúcidos como amarelo-claros apresentaram células grandes, porém, estas com poucos e proeminentes espaços intercelulares, respectivamente e ambos com citoplasma estreito. Porém, quanto a organelas, ambos apresentam mitocôndrias e retículo endoplasmático, mas com diferenças quanto à quantidade. O calo translúcido apresenta quantidades maiores comparado às do calo amarelo-claro que contém parede celular espessa. Há diferenças também quanto à quantidade de grãos de amidos, ou seja, os calos translúcidos não os apresentam, e os calos amarelo-claros os apresentam em poucas quantidades. Isso, provavelmente, está interferindo na coloração dos mesmos, como também a parede espessa do calo amarelo-claro pode estar contribuindo para a coloração do mesmo.

O aumento da parede celular é também considerado uma característica de células embriogênicas para garantir seu isolamento e, conseqüentemente, a expressão da totipotência (Williams & Maheswaran, 1986). No interior da parede, as células sofrem uma série de divisões que conduzem à formação de proembriões que, conseqüentemente, apresentam origem unicelular.

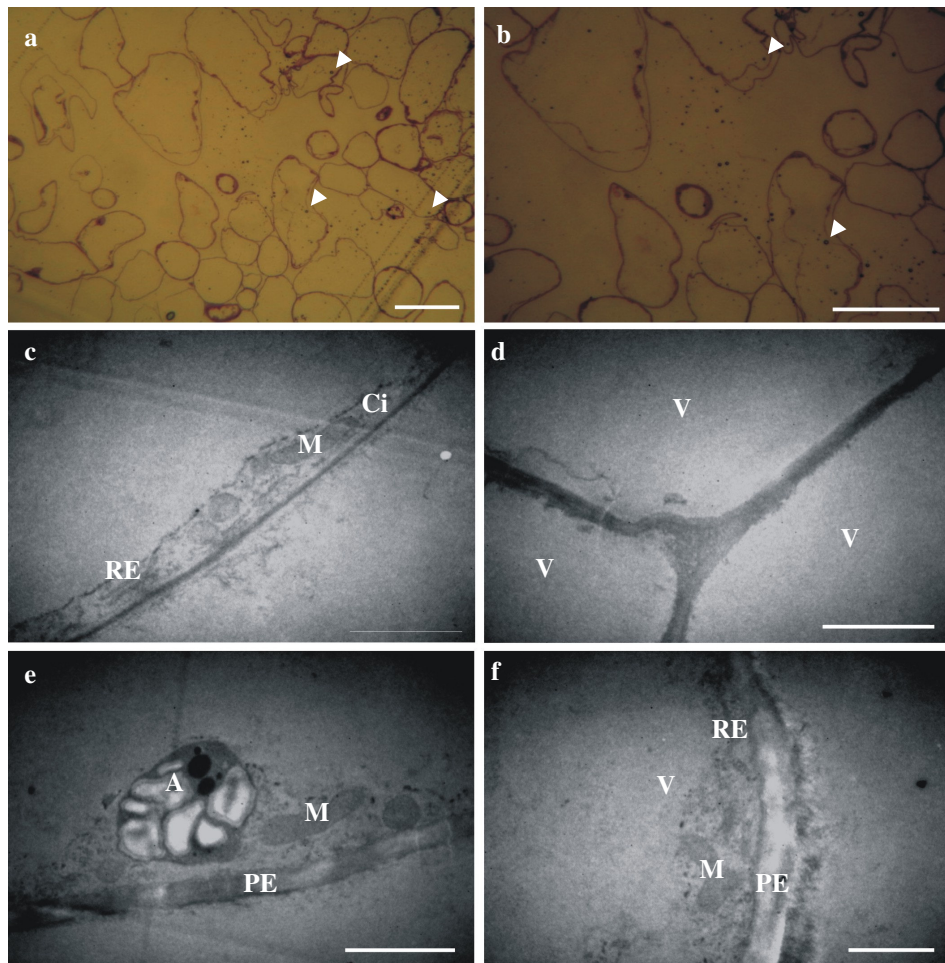


FIGURA 17. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos de coloração amarelo-clara de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, A = amido, PE = parede espessa. Em a e b, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μ m (a, b), 2 μ m (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

De acordo com Canhoto et al. (1996), as células meristemáticas possuem um citoplasma rico, constituído de muitos ribossomos, alguns grãos de amido, pequenas seções de retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocôndrias e

são ausentes em lipídeos e proteínas de reserva. As células dos proembriões apresentam as mesmas características das células meristemáticas, entretanto, mais vacuolizadas e, em alguns casos, com presença de lipídeos na região periférica do citoplasma. Algumas células dos proembriões mostram-se altamente vacuolizadas, com apenas uma fina camada do citoplasma entre o tonoplasto e a membrana plasmática. No presente trabalho, foi também observado citoplasma estreito, nos calos translúcidos e amarelo-claros (Figuras 16 e 17).

A regeneração de plantas por via indireta, após a produção de calos a partir de células (protoplasto) ou tecidos, foi caracterizada por estudos morfológicos e histológicos que caracterizaram três tipos distintos de tecidos de calos com variações na cor, na estrutura e na resposta morfogenética. O primeiro tipo apresenta calos compactos (globulares ou nodulares), de cor amarelo-clara e denso, constituído de pequenas células isodiamétricas; o segundo tipo descrito apresenta calos irregulares, soltos, consistindo de células arranjadas afrouxadamente; quanto à cor são mais semitranslúcidos do que os anteriores, com regiões densas pouco coloridas e, finalmente, o terceiro tipo de tecidos de calos apresenta formato irregular, extremamente soltos, com células alongadas, tubulares, grandes, translúcidas e não morfogênicas (Schumann et al., 1995).

De acordo com estes autores, somente no primeiro tipo de calo foi observado o desenvolvimento de camadas de células semelhantes ao procâmbio, o que coincide com a fase de proliferação. Este tipo de calo apresentou, ainda, um grupo de células com alta atividade de divisão, mais organizadas, compactas, com citoplasma denso, resultando na formação de meristemóides, que originaram brotos adventícios que se diferenciaram na superfície abaxial do calo. Ho & Vasil (1983) classificam centros meristemáticos como embrióides. Em contrapartida, Trevizam (2005) supõe que a presença desses centros

meristemáticos indica processos morfogenéticos capacitados para a formação de raízes e ou pré-embriões somáticos.

Contradizendo as afirmações feitas por Schumann et al. (1995), as células dos calos amarelo-claros do presente trabalho não apresentaram características morfogênicas (Tabela 3). No entanto, de acordo com os autores, células dos calos translúcidos apresentaram aspectos semelhantes, obtendo caracterizações não morfogênicas (Tabela 3).

TABELA 3. Características de células não-morfogênicas dos calos translúcidos e amarelo-claros, obtidos de folhas cotiledonares de *P. gibertii*, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Translúcido	Amarelo-claro
Células com formato isodiamétrico, alongado e oblongo	Predominância de células com formato alongado
Sistema celular desorganizado	Sistema celular desorganizado
Células grandes	Células grandes
Sem grãos de amido detectáveis	Pouco conteúdo de amido
Citoplasma estreito	Citoplasma estreito

Quando se observam as micrografias dos calos amarelo-escuros (Figura 3 c), observam-se células bem organizadas (Figura 18 a, b), com predomínio de células de formato isodiamétrico, porém, com algumas formas alongadas (Figura 18c, d).

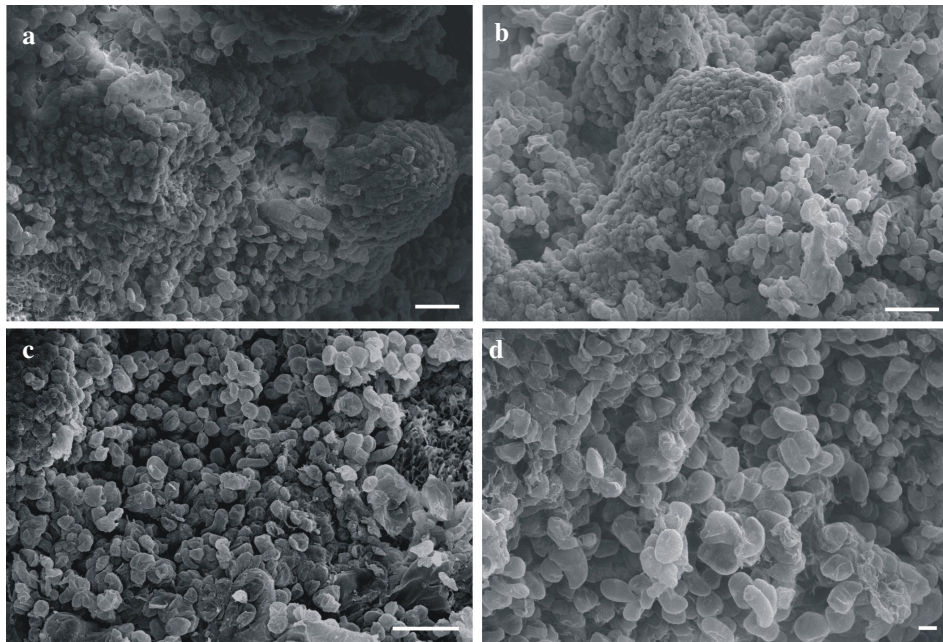


FIGURA 18. Eletromicrografias de varredura de calos de coloração amarelo-escuro de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b, c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Nos estudos em MET de calos amarelo-escuros, observam-se células pequenas com espaços intercelulares e grãos de amido (Figura 19 a, b). Há, ainda, citoplasma denso, rico em mitocôndrias (Figura 19 c) e retículo endoplasmático (Figura 19 e), núcleo com nucléolo proeminente (Figura 19 c) e de formato arredondado (Figura 19 d). Apresentam vacúolo pequeno (Figura 19 c) e vesículas secretoras (Figura 19 f), com quantidade significativa de grãos de amido. O conteúdo celular deste calo, provavelmente, está proporcionando a coloração amarelo escuro do mesmo, sendo rico em organelas e amido.

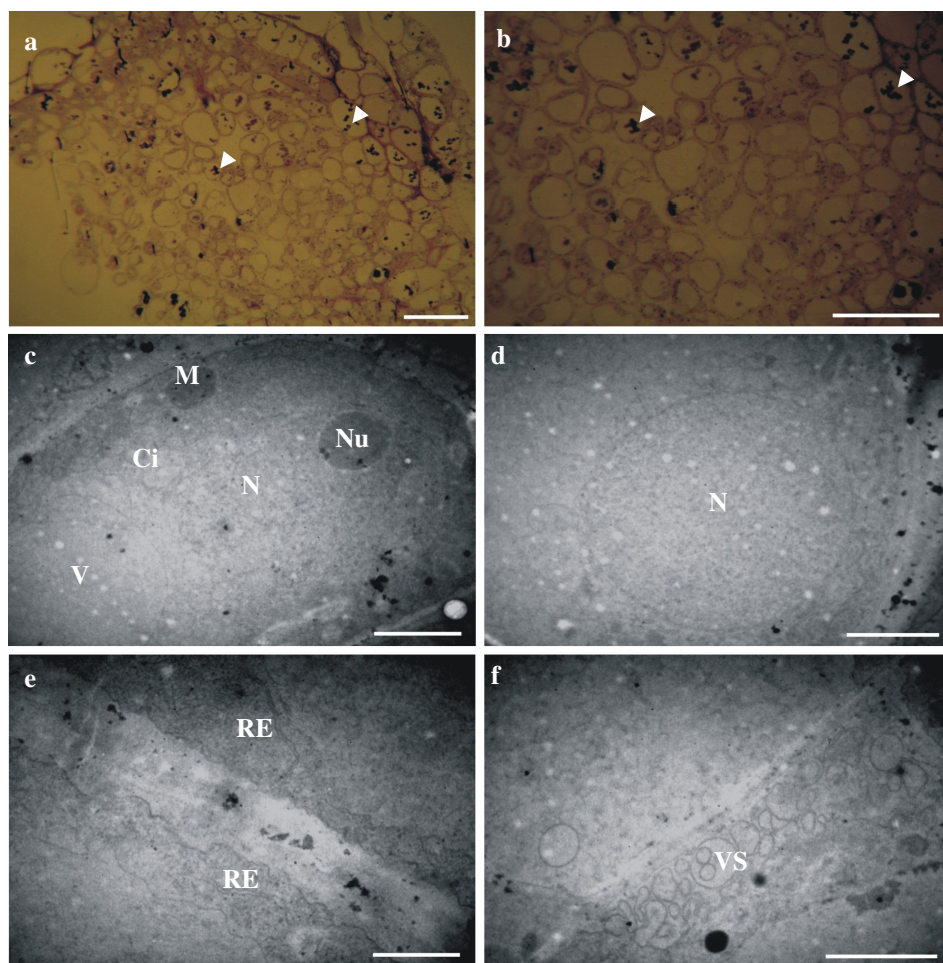


FIGURA 19. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos de coloração amarelo-escuro de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, N = núcleo, Nu = nucléolo, VS = vesículas secretoras. Em a e b, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c, d, f), 1 μm (e). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fernando (1999) observou que explantes cotiledonares de soja (*Glycine max*) inoculados em meio de cultura contendo 181 μM de 2,4-D apresentaram coloração amarelada e formação de uma massa de calo friável de aspecto

gelatinoso, a qual não desenvolve qualquer estrutura embriogênica. A análise anatômica desses explantes revelou a proliferação celular desorganizada e uma vacuolização acentuada das células do mesofilo cotiledonar. Assim sendo, essa proliferação celular não apresentava padrões celulares normalmente relacionados com o processo embriogênico *in vitro* (Williams & Maheswaran, 1986).

Acumulação de amido parece estar relacionada ao caráter embriogênico das células (Profumo et al., 1987). De fato, outros trabalhos têm mostrado que, antes de se tornarem morfogenéticas (organogênese ou embriogênese), as células sintetizam e armazenam uma considerável quantidade de amido (Button et al., 1974; Williams & Maheswaran, 1986).

Schwendiman et al. (1988) consideram o amido e o acúmulo de reservas de lipídeo como indicadores do potencial embriogênico dos tecidos em palmeira (*Elaeis guineensis*), uma vez que vêm acompanhando a diferenciação de embriões somáticos. Já observações em outras espécies mostram que os últimos estágios da embriogênese somática que conduz ao desenvolvimento dos embriões são caracterizados por reservas extremamente baixas.

Bezerra et al. (2001) caracterizam calos embriogênicos de milho, cultivar Jatinã C3 Anão, como sendo compactos, amarelados e com nodulações evidentes na superfície. Schwendiman et al. (1988) afirmam que células embriogênicas são pequenas, com um grande núcleo contendo muitos nucléolos proeminentes, citoplasma denso, grande quantidade de amido e pequenos vacúolos.

Como visto no atual estudo, calos de coloração amarelo-escura apresentaram significativa quantidade de grãos de amido, bem como outras características que possibilitam concluir, baseando-se nos resultados relatados pelos autores anteriormente citados, que estes apresentam características embriogênicas.

De acordo com Schumann et al. (1995), a formação do embrião somático, via indireta, consiste na seqüência do desenvolvimento do calo que, primeiramente, forma uma massa fina, aquosa e translúcida, consistindo de células alongadas, seguida da formação de uma massa de calos compactos, quebradiços e de coloração amarelada com células isodiamétricas e, finalmente, a formação de estruturas globulares, como os embriões. Os resultados obtidos pelos autores citados acima confirmam as características embriogênicas da coloração amarelo-escuro e não embriogênicas dos calos translúcidos, obtidas no presente trabalho.

As células verificadas na Figura 20, oriundas dos calos de coloração branca (Figura 3 b), são de formato isodiamétrico (Figura 20 a ,d); já as observadas na Figura 20 b, d apresentam formato alongado, predominantemente.

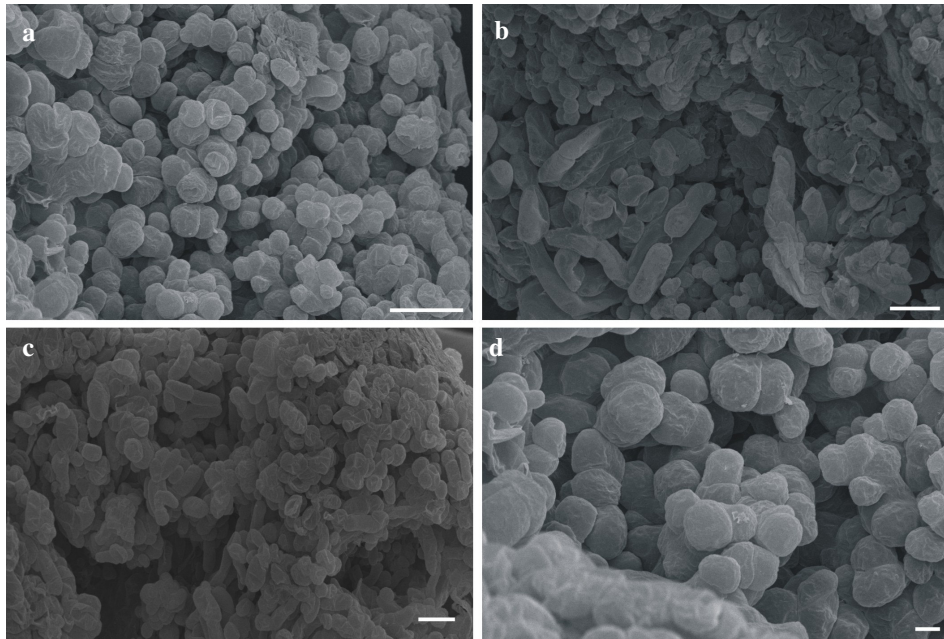


FIGURA 20. Eletromicrografias de varredura de calos de coloração branca de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b, c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Calos de coloração branca apresentaram células medianas com espaços intercelulares muito proeminentes (Figura 21 a, b), de citoplasma denso, rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático (Figura 21 c-f). Observaram-se, ainda, pequenos vacúolos (Figura 21 e) e presença de grãos de amido (Figura 21 d).

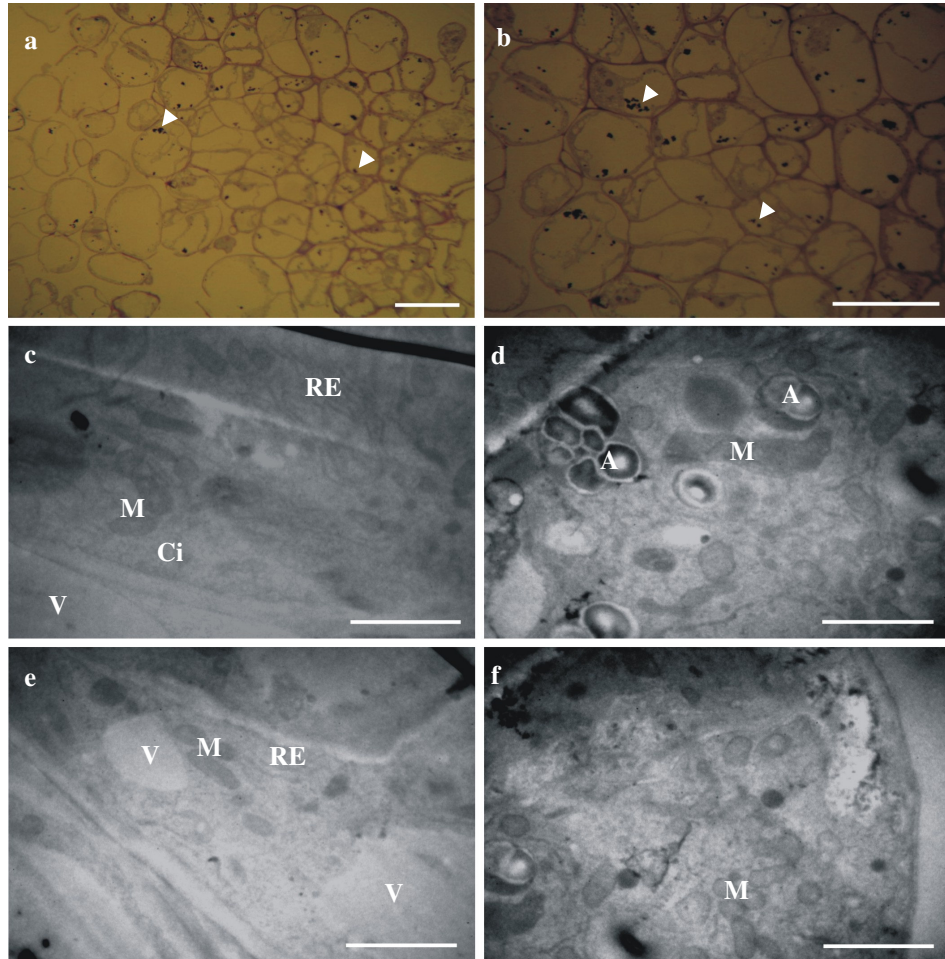


FIGURA 21. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos de coloração branca de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, A = amido. Em a e b, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μ m (a, b), 2 μ m (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

A caracterização dos calos de coloração branca e amarela (Figura 3 e) mostrou que há um desarranjo celular extenso, porém, com algumas células isodiamétricas (Figura 22 a, d).

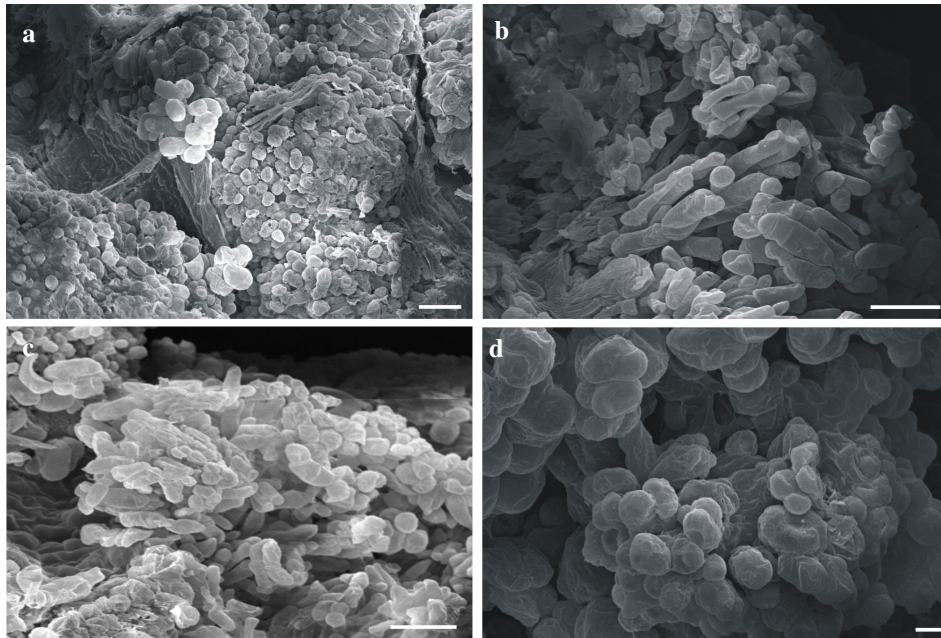


FIGURA 22. Eletromicrografias de varredura de calos de coloração branca e amarela de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b, c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para os estudos dos calos de coloração branca e amarela, as células são medianas, com espaços intercelulares pequenos, proporcionando aspecto organizado (Figura 23 a, b). Seu citoplasma denso, rico em mitocôndria e retículo endoplasmático pode ser observado na Figura 23 (d, e). Como, para calos de coloração amarelo-escuro, estes apresentam nucléolo proeminente, mas a forma do seu núcleo é irregular (Figura 23 c). Há, ainda, a presença de vacúolo grande (Figura 23 a, b), como pode ser observado para os calos de coloração

amarelo-clara. Com presença de vesículas secretoras (Figura 23 f) e de grão de amido (Figura 23 d), como é observado também para os calos de coloração amarelo-escuro (Figura 19 f, a, b).

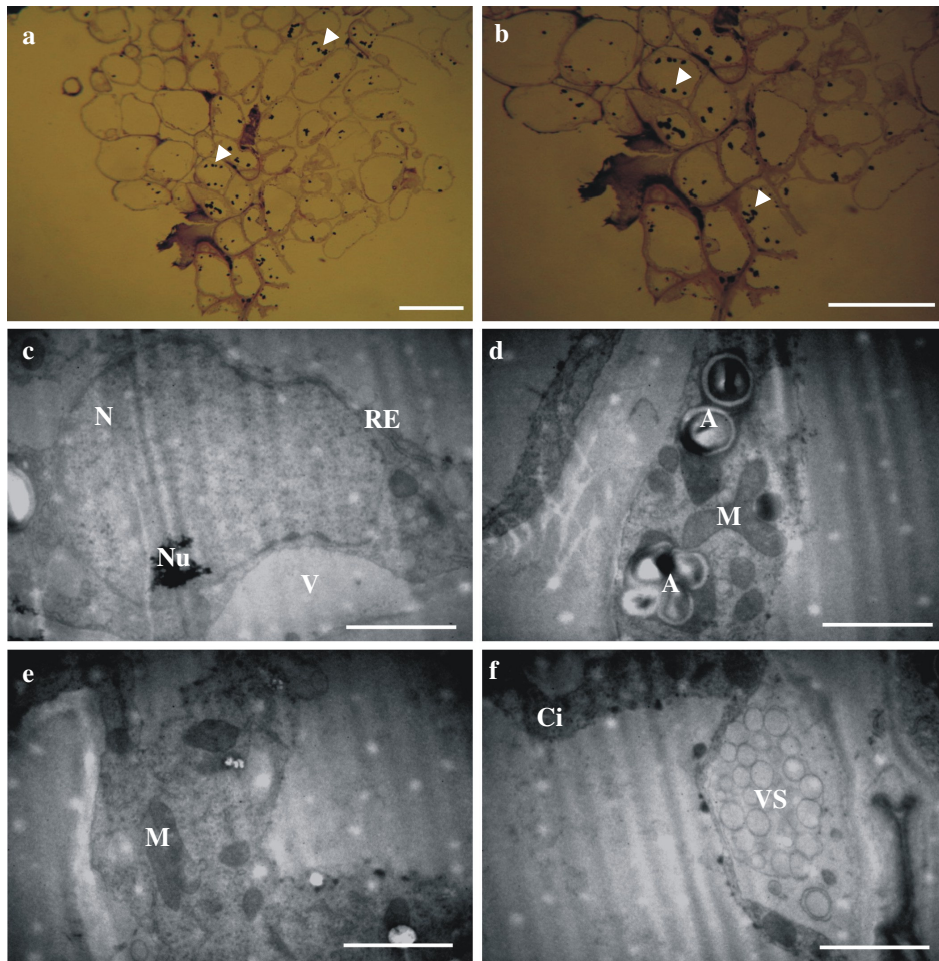


FIGURA 23. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos de coloração branca e amarela de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, N = núcleo, Nu = nucléolo, A = amido, VS = vesículas secretoras. Em a e b, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c, d, e, f). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Yeh & Chang (1986) observaram três tipos de calos de *Bambusa oldhamii*: embriogênicos (calos compactos semelhantes a nódulos, de coloração branca a amarela, e brilhante úmido), não embriogênicos (calos friáveis, consistindo de células filamentosas que produziram raízes adventícias com pelos) e tipo intermediário (calo gelatinoso com características dos tipos citados anteriormente).

El Hassan & Deberg (1987) observaram dois tipos de calos de *Phyllostachys viridis*: embriogênicos (compactos, opacos, de coloração branca, apresentando corpos globulares brilhantes) e não embriogênicos (coloração amarelo).

De acordo com Komatsu (1995), a característica globular e a coloração branco-amarelada do calo estão associadas à sua capacidade morfogênica.

Calos de coloração branca e marrom (Figura 3 f) apresentaram células bem organizadas, com predominância de formato isodiamétrico (Figura 24 a, b, d), porém, há ocorrência de células alongadas (Figura 23 c).

Verifica-se, para calos de coloração branca e marrom, células pequenas sem espaços intercelulares visíveis (Figura 25 a, b). Apresentam, ainda, núcleo isodiamétrico e citoplasma denso, rico em mitocôndria e retículo endoplasmático (Figura 25 c-d), como ocorre com os calos de coloração branca e amarela (Figura 23 d, e). Observa-se, ainda, a presença de vacúolos grandes em algumas células (Figura 25 f), como a presença de amido em quantidades significativas, com pouco depósito de compostos fenólicos, provavelmente só observado para esta coloração de calo.

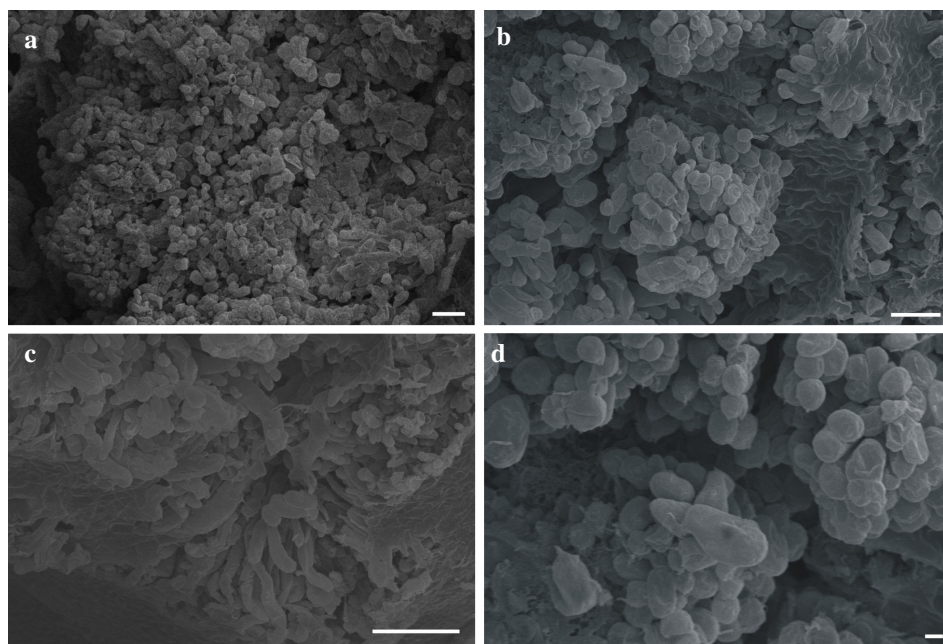


FIGURA 24. Eletromicrografias de varredura de calos de coloração branco e marrom de *P. gibertii*. Barras = 100 μm (a, b), 200 μm (c), 20 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Mikuła et al. (2005) observaram que as células dos calos de *Gentiana cruciata* (L), eram pequenas, pouco vacuolizadas, com citoplasma denso e contendo organelas aparentemente ativas, como mitocôndrias (formato oval e aparência tipicamente meristemática), complexo de Golgi e multicamadas de retículo endoplasmático. Durante a 6^a e a 8^a semanas de cultivo, massas de embriões somáticos foram formadas.

Sané et al. (2006) observaram que calos primários foram nodulares compactos (globulares) e as células meristemáticas pequenas, com citoplasma denso e muito rico em proteínas solúveis totais. Os calos secundários apresentaram aspecto granular friável (células embriogênicas), em divisão ativa, com células ricas em proteínas solúveis no citoplasma, vacúolos pequenos, com núcleo grande e nucléolo facilmente visível. Algumas células continham grãos

de amido. Em suspensão celular, as células embriogênicas apresentaram-se com vários vacúolos pequenos e citoplasma rico em grãos de amido agrupados ao redor do núcleo.

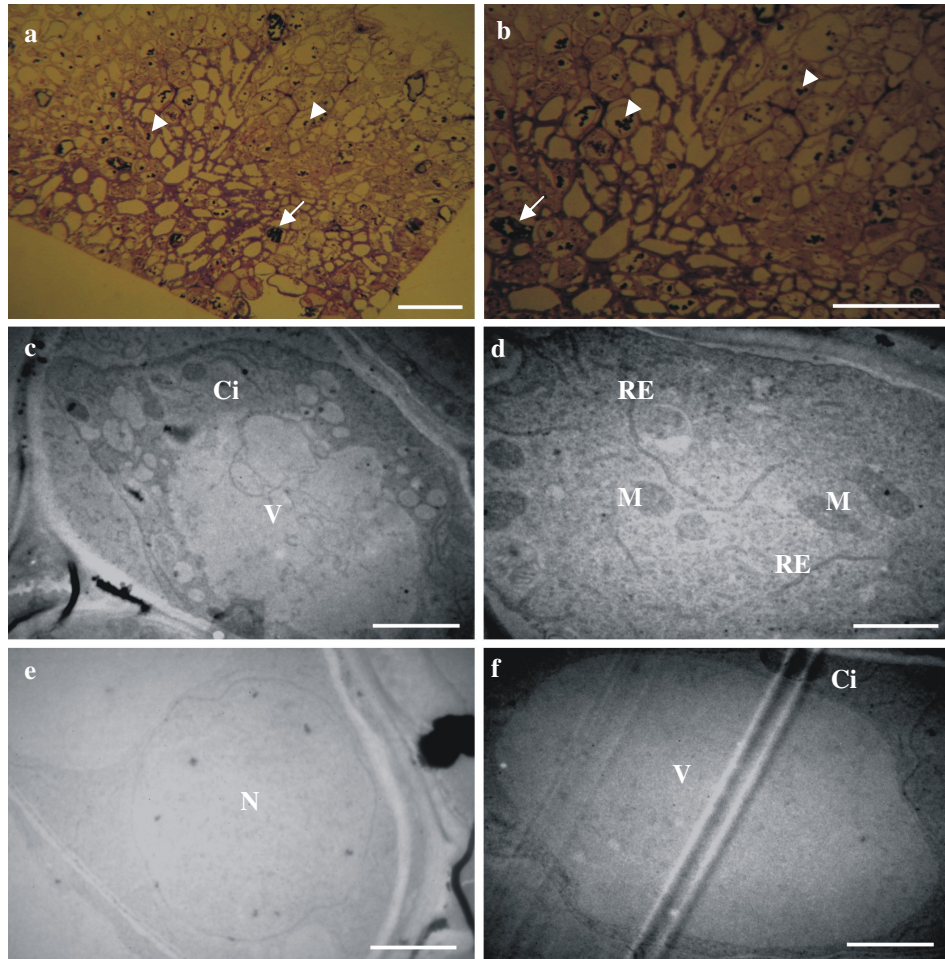


FIGURA 25. Fotomicrografias (a-b) e eletromicrografias de transmissão (c-f) de células dos calos de coloração branca e marrom de *P. gibertii*. M = mitocôndria, RE = retículo endoplasmático, Ci = citoplasma, V = vacúolo, N = núcleo. Em a e b, células com acúmulo de compostos fenólicos = setas, grãos de amido = pontas de seta. Barras = 50 μm (a, b), 2 μm (c, e, f), 1 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Profumo et al. (1987) observaram três tipos de calos em *Aesculus hippocastanum* L. O primeiro tipo, calo precursor, apresentou escassez de espaços intercelulares e ocorrência de vacúolos autofágicos nas células. No segundo tipo, calo friável embriogênico, as células mostraram características citológicas típicas de um alto nível metabólico e contendo amido. Finalmente, no terceiro tipo, calo não embriogênico, as células eram maiores e altamente vacuolizadas, desprovidas de amido e com citoplasma rico em organelas. Apesar do alto grau de crescimento, não atingiram competência embriogênica a tempo. Calos de coloração amarelo-escura e branco e marrom do presente trabalho, baseando-se nos autores citados acima, apresentaram em comum, características de células embriogênicas (Tabela 4).

TABELA 4. Características de células embriogênicas dos calos amarelo-escuros e branco-marrom, obtidos de folhas cotiledonares de *P. gibertii*, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Amarelo-escuro	Branco e marrom
Predominância de células com formato isodiamétrico	Predominância de células com formato isodiamétrico
Sistema celular organizado	Sistema celular organizado
Células pequenas	Células pequenas
Citoplasma denso e rico em mitocôndria e retículo endoplasmático	Citoplasma denso e rico em mitocôndria e retículo endoplasmático

4 CONCLUSÕES

Explantos foliares de *P. gibertii*, mantidos em meio de cultura MS no escuro, acrescido de BAP (8,88 μM) e água de coco (5%), por 30 dias, induzem a formação de calos que, posteriormente, transferidos para meio MS, na presença de luz e contendo BAP (2,22 μM), formam calos organogênicos, cujos parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, núcleo com nucléolo proeminente, presença de grãos de amido e citoplasma denso e rico em retículo endoplasmático.

O regulador 2,4-D proporciona a obtenção de calos com características embriogênicas (células com formato isodiamétrico, pequenas e com pequeno espaço intercelular, sistema celular organizado, predominância de mitocôndrias de formato arredondado), enquanto resultados negativos (predominância de células com formato alongado, células maiores e com espaços intercelulares, sistema celular desorganizado, predominância de mitocôndrias de formato alongado) são observados para picloram.

Calos translúcidos e amarelo-claros apresentam características não-morfogênicas, como células de diferentes formatos, sistema celular desorganizado, células grandes e ausência ou pouco conteúdo de amido.

Calos de coloração amarelo-escura e branco e marrom apresentam características embriogênicas e os parâmetros morfológicos e ultra-estruturais associados são predominância de células com formato isodiamétrico, sistema celular organizado, células pequenas, citoplasma denso e rico em mitocôndria e retículo endoplasmático.

5 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, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 382-407.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 429-437, jul./set. 2004.
- BEZERRA, J. S.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 259-263, abr./jun. 2001.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C. H. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 25, n. 92, p. 446-457, May/June 1974.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, London, v. 78, n. 4, p. 513-521, Oct. 1996.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 515-519, June 1988.
- COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 474-506.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological Analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, London, v. 70, n. 5, p. 477-482, Nov. 1992.

EL HASSAN, A. A.; DEBERGH, P. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (young) McClure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 73-77, 1987.

EL MAÂTAOUI, M.; ESPAGNAC, H.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 66, n. 2, p. 183-190, Aug. 1990.

FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1999. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FIORE, M. C.; TRABACE, T.; SUNSERI, F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 5, p. 295-298, Feb. 1997.

HO, W.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, Viena, v. 118, n. 3, p. 169-180. 1983.

KOMATSU, Y. H. **Estudo da morfogênese em calos de *Phyllostachys bambusoides* Sieb. & Zucc.** 1995. 105 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MARBACH, P. A. S. **Calogênese e embriogênese somática em berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 1998. 73 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MATHEWS, H. Morphogenetic responses from *in vitro* cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 233-240, 1987.

MIKUŁA, A.; TYKARSKA, T.; KURAS, M.; RYBCZYŃSKI, J. J. Somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.): histological and ultrastructural changes in seedling hypocotyl explant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Largo, v. 41, n. 5, p. 686-694, Sept./Oct. 2005.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado) – 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.

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville]**. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NUTI RONCHI, V.; GIORGETTI, L. Basic and fundamental aspects of somatic embryogenesis – The cell's commitment to somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 – Somatic embryogenesis and synthetic seed, I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 3-19.

ÖZCAN, S.; BARGHCHI, M.; FIREK, S.; DRAPER, J. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 271-277, Sept. 1993.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**, Vienna, v. 138, n. 2/3, p. 89-97, 1987.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wright wrinkle — free sections on formvar — coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 151-155, 1975.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 2, p. 301-308, Aug. 2006.

SANTOS, I.; GUIMARÃES, I.; SALEMA, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Nerium oleander*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 83-86, Apr. 1994.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 – Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 71-86.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 1, p. 43-52, July 1988.

TOMAR, U. K.; GUPTA, S. C. Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume – *Albizia richardiana* King. **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 70-73, Jan. 1988.

TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio.** 2005. 167 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

WILLIAMS E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, n. 4, p. 443-462, Apr. 1986.

YEH, M. L.; CHANG, W. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 73, n. 2, p. 161-163, 1986.

ZUO, J. R.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G.; CHUA, N. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 349-359, May 2002.

ANEXOS

ANEXO 1. Solução nutritiva MS.

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
1	NH ₄ NO ₃	82500	20	1650,00
2	KNO ₃	95000	20	1900,00
3	H ₃ BO ₃	1240	5	6,20
	KH ₂ PO ₄	34000		170,00
	KI	166		0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50		0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5		0,025
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	50	440,00
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	74000	5	370,00
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4460		22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720		8,6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5		0,025
6	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7450	5	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5570		27,85
Vitaminas	Tiamina HCl	50	10	0,50
	Piridonina HCl	50		0,50
	Ac. nicotínico	50		0,50
Aminoácido	Glicina	80	25	2,00
Hexitol	Mio-inositol	2000	50	100,00
Açúcar	Sacarose (3%)	--	--	30000,00

ANEXO 2. Solução nutritiva MSM.

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
1	NH ₄ NO ₃	82500	12,12	1000,00
2	KNO ₃	95000	16	1520,00
3	H ₃ BO ₃	900	5	4,50
	KH ₂ PO ₄	54400		272,00
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50		0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5		0,025
4	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	40000	32,5	1300,00
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	30800	20	616,00
	MnSO ₄ .4H ₂ O	1400		28,00
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	145		2,9
	CuSO ₄ .5H ₂ O	62,5		1,25
6	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7450	10	74,84
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5570		55,60
Vitaminas	Tiamina HCl	10	10	0,10
	Piridonina HCl	50		0,50
	Ac. nicotínico	50		0,50
Aminoácido	Glicina	80	25	2,00
Hexitol	Mio-inositol	2000	50	100,00
Açúcar	Sacarose (3%)	--	--	30000,00