

LUCIANO BUENO DOS REIS

**MORFOGÊNESE *in vitro* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
MARACUJAZEIROS (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P.*
cincinnata Masters)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

T

R375m
2005

Reis, Luciano Bueno dos, 1976-

Morfogênese *in vitro* e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters) / Luciano Bueno dos Reis. - Viçosa: UFV, 2005.

ix, 105f. : il. ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografias.

1. Maracujá – Propagação *in vitro*. 2. Maracujá – Melhoramento genético. 3. Tiosulfato de prata. 4. Agrobacterium. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.4253

LUCIANO BUENO DOS REIS

**MORFOGÊNESE *in vitro* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
MARACUJAZEIROS (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P.*
cincinnata Masters)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 13 de Maio de 2005.

Prof. Fernando Luiz Finger

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

Prof. Aloisio Xavier

Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Aos meus pais, Messias e Matilde.

Aos meus irmãos, Lucas e Lucio.

À minha namorada, Larisse.

Aos meus familiares e amigos

De coração, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e às agências de fomento em pesquisa: CNPq, CAPES e FAPEMIG. Meus agradecimentos pela concessão da bolsa de estudos e suporte para a realização do presente trabalho.

À toda a “família” do LCTII e em especial ao Professor Wagner, meus mais sinceros agradecimentos por todos os momentos de convívio e aprendizagem compartilhados. Guardo de todos vocês, meus amigos, muito boas lembranças e saudades.

BIOGRAFIA

LUCIANO BUENO DOS REIS, filho de Messias Bueno dos Reis e Matilde do Carmo Reis, nasceu em 15 de janeiro de 1976, na cidade de Passos, estado de Minas Gerais.

Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora em 1998, iniciou seu mestrado em Fisiologia Vegetal em março de 1999 na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em março de 2001.

Nesse mesmo ano, deu início ao seu doutorado, também em Fisiologia Vegetal, o qual concluiu em abril de 2005.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	ix
Introdução Geral	01
Referências Bibliográficas	07

Capítulo I

Germinação e regeneração *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Masters via organogênese e embriogênese

1. Introdução	13
2. Material e Métodos	16
3. Resultados	20
4. Discussão	28
5. Referências Bibliográficas	34

Capítulo II

Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters) mediada por *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*

1. Introdução	39
2. Material e Métodos	42
3. Resultados	48

4. Discussão	63
5. Referências Bibliográficas	69

Capítulo III

Efeito de reguladores de crescimento e do tiossulfato de prata sobre a regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)

1. Introdução	74
2. Material e Métodos	76
3. Resultados	78
4. Discussão	82
5. Referências Bibliográficas	85

Capítulo IV

Efeito de enzimas pecto-celulolíticas sobre a regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)

1. Introdução	88
2. Material e Métodos	90
3. Resultados	93
4. Discussão	97
5. Referências Bibliográficas	100

Resumo e Conclusões Gerais	104
---	------------

RESUMO

REIS, Luciano Bueno, D.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2005.
Morfogênese *in vitro* e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters).
Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Raimundo Santos Barros e Eliemar Campostrini.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo de diversos fatores que influenciam a morfogênese *in vitro* e o estabelecimento e implementação de protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium* para duas espécies de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata*). O método de retirada total do tegumento da semente foi efetivo para a germinação de *P. cincinnata*, sendo a maior produção de plântulas normais obtida em meio MS na sua força total. Melhor resultado de regeneração em *P. cincinnata* foi obtido em meio MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ de BAP e 10% (v/v) de água de coco, sendo indicado a redução da concentração de BAP pela metade aos 15 dias, no primeiro subcultivo. O uso de ágar Vetec para essa espécie é aconselhável, tendo em vista seu menor custo e maior rendimento obtido de ramos por explante. Apesar do bom alongamento dos ramos regenerados, o enraizamento e a manutenção desses ramos quando individualizados não foi satisfatória. Embriogênese somática foi observada no tratamento cujo meio de cultura foi suplementado apenas com água de coco. Os calos obtidos nesse tratamento foram bastante proliferativos e os embriões formados, em geral, normais. A germinação desses embriões gerou plântulas morfológicamente normais, as quais puderam ser aclimatadas. Explantes hipocotiledonares das duas espécies de maracujazeiro estudadas se mostraram bastante resistentes à Higromicina.

Em teste realizado com *P. cincinnata*, a Higromicina foi menos ativa em meio gelificado com ágar Vetec, em comparação com aquele gelificado com Phytigel. Solução de *Agrobacterium* com densidade ótica ($\lambda = 600$ nm) ajustada para 0,25 se mostrou mais eficiente que aquela ajustada para 0,50. Foram obtidas raízes transformadas por *A. rhizogenes* de ambas as espécies. Em raízes transformadas de *P. cincinnata* mantidas em meio seletivo, sem reguladores de crescimento, foi observada a formação de gemas e embriogênese somática. Plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, transformadas com *A. tumefaciens* SHOOTER, regeneradas em meio sem reguladores de crescimento, não apresentaram reação histoquímica positiva para *gus*, embora a reação e PCR com *primers* específicos tenha indicado a presença desse gene no DNA genômico das plantas regeneradas. A combinação de reguladores proposta por DREW (1991) foi eficiente na indução *de novo* de gemas adventícias em explantes cotiledonares e hipocotiledonares, sendo o acréscimo de 10 μ M de STS importante para o incremento do número de ramos, principalmente em explantes hipocotiledonares, que se mostraram mais sensíveis ao etileno. O tratamento com enzimas pecto-celulolíticas foi bastante eficiente na indução de regeneração ao longo do explante, sendo essa uma característica que poderá ser bastante útil em protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium*.

ABSTRACT

REIS, Luciano Bueno, D.S., Universidade Federal de Viçosa, May of 2005.
Morfogênese *in vitro* e genetic transformation of maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters).
Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Raimundo Santos Barros e Eliemar Campostrini

The present work had for objective study of diverse factors that influence the *in vitro* morphogenesis and the genetics *Agrobacterium*-mediated transformation for two species of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata*). The total withdrawal of teguments of seeds method was effective for the germination of *P. cincinnata*, being the biggest production of normal seedlings was obtained in half salts concentration of MS media. Better resulted of regeneration in *P. cincinnata* it was gotten in MS media supplemented with 0,5 mg l⁻¹ of BAP and 10% (v/v) of coconut water, being indicated the reduction of the concentration of BAP for the half to 15 days, in the first subculture. The use of Vetec™ agar-agar is advisable, having in sight its lesser cost and greater income of branches for explant. Despite the good along of the regenerated branches, the rooting and the maintenance of these branches when isolated was not satisfactory. Somatic embryogenesis was observed in the treatment whose media was supplemented only with coconut water. Callus gotten in this treatment had been very proliferated and the embryos formed, in general, were normal. The germination of these embryos generated seedlings morphologically normal, which could have been acclimatized. Hypocotyls explants of the two studied species of yellow passion fruit showed sufficiently resistant to the

Hygromycin. In test carried through with *P. cincinnata*, the Hygromycin was less active in media gelling with Vetec™ agar-agar in comparison with the one with Phytigel™. Solution of *Agrobacterium* with optical density ($\lambda= 600$ nm) adjusted for 0.25 showed more efficient that that one adjusted for 0.50. They had been gotten roots transformed for *A. rhizogenes* of both the species. In roots transformed of *P. cincinnata* kept in selective media, without growth regulators, it was observed the formation of buds and somatic embryogenesis. Plants of *P. edulis* f. *flavicarpa*, transformed with *A. tumefaciens* SHOOTER, regenerated in way without growth regulators not they had presented positive histochemical reaction for *gus*, even so reaction e PCR with *primers* specific it has indicated the presence of this gene in the DNA genomic of the regenerated plants. The plant growth regulators combination of proposal for DREW (1991) it was efficient in the induction *de novo* of adventitious buds in cotyledon and hypocotyl explants, being the addition of 10 μ M of STS was important for the increment of the number of branches, mainly in hypocotyl explants, that they had revealed more sensible to the ethylene. The treatment with pecto-cellulolytics enzymes were efficient in the induction of regeneration to long of the explant, being this one characteristic that it could be very useful in protocols of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá, posição conquistada desde o final da década de 70 (SÃO JOSÉ, 1991; PIZA JÚNIOR, 1998). Segundo dados da Produção Agrícola Municipal (IBGE, 2003), a produção nacional foi de 485.342 toneladas. As regiões Nordeste e Sudeste são responsáveis por 84,8% desse total. Bahia, Espírito Santo e São Paulo são os três principais estados produtores, responsáveis por 47,52% da produção nacional. O estado de Minas Gerais figura na oitava colocação nacional, com produção de 28.606 toneladas (IBGE, 2003).

Na maioria das vezes, essa fruteira é cultivada em pequenas propriedades, tendo um período de colheita bastante estendido, variando de 8 meses na região Sudeste e 10 meses na região Nordeste, existindo a necessidade de renovação do pomar a cada 2 anos, devido a queda de produção causada por doenças (SOUZA et al., 2002). Esses fatores contribuem um fluxo de renda mensal equilibrado e para o emprego da mão-de-obra familiar, possibilitando a fixação do agricultor no campo (SOUZA et al., 2002).

O gênero *Passiflora* é um dentre os 12 gêneros que compõem a família *Passifloraceae*, ordem *Violales*, subclasse *Dilleniidae* da classe *Magnoliopsida* (CRONQUIST, 1988). É constituído por plantas herbáceas ou lenhosas, de hábito trepador, apresentando-se como ervas ou arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas. As espécies desse gênero diferem-se das dos demais gêneros da família pela presença de cinco estames, cinco pétalas e cinco sépalas, pelo ginandróforo ereto com estames de extremidades livres e com três estigmas (TEIXEIRA, 1994). A região tropical da América do Sul é o provável local de origem, sendo a Região Centro-

Norte do Brasil seu principal centro de distribuição geográfica (KILLIP, 1938, citado por TEIXEIRA, 1994). Não há consenso quanto ao número de espécies que compõem esse gênero, podendo o número variar de cerca de 347 a mais de 600 espécies, conforme o autor (MANICA, 1997). Dessas espécies, cerca de 150 são nativas do Brasil (HOEME, 1947, citado por TEIXEIRA, 1994).

De todas as espécies do gênero *Passiflora*, cerca de 50 a 60 são édulcas, podendo ser aproveitadas na alimentação humana. Entretanto, poucas são as espécies cultivadas ou com importância econômica, quer pela qualidade alimentícia dos frutos, quer pela adaptabilidade como trepadeiras ornamentais ou propriedades medicinais. Dentre as espécies de maracujá cultivadas destacam-se *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. ligularis*, *P. mollissima* e *P. quadrangularis* (MARTIN e NAKASONE, 1970; TEIXEIRA, 1994).

A despeito da grande diversidade de espécies nativas do Brasil, cerca de 95% dos cultivos no país são formados por *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener, conhecido como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo. Este é preferido entre os produtores devido a várias características como qualidade dos frutos, vigor, produtividade e rendimento de suco (MELETTI e MAIA, 1999). *P. alata* Dryand ou maracujá-doce, embora menos conhecida, vem sendo explorada comercialmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (PIZA JÚNIOR, 1998), destinando-se sua produção basicamente ao consumo *in natura*.

Apesar de o Brasil ser o principal produtor mundial de maracujá, trabalhos envolvendo o melhoramento dessa fruteira em nosso país ainda são escassos (BRUCKNER, 1997). Materiais denominados Maguary e Sul-Brasil, os quais apresentam características interessantes, já são cultivados há alguns anos na região sudeste. Mais recentemente, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou um programa de melhoramento genético para o maracujá-amarelo, com o objetivo de desenvolver um cultivar mais homogêneo quanto à qualidade dos frutos, com maior produtividade e melhor aceitação para o mercado de frutas frescas (MELETTI e MAIA, 1999).

Além da falta de cultivares com características definidas e garantia de origem disponíveis no mercado, a multiplicação das plantas em escala comercial é feita, predominantemente, por via sexuada (MELETTI e MAIA, 1999). Essa prática leva à obtenção de plantas com alta variabilidade

genética e desuniformes para inúmeros caracteres agronômicos. Tal variabilidade é consequência das características florais, que propiciam a alogamia, além da marcante auto-incompatibilidade.

A cultura do maracujá apresentou uma rápida expansão nos últimos anos sem que cuidados de ordem fitossanitária fossem tomados, o que gerou diversos problemas, muitas vezes tornando o ciclo econômico da cultura mais curto, ou mesmo inviabilizando o cultivo em diversas áreas, impondo um caráter migratório à cultura (SANTOS FILHO e JUNQUEIRA, 2003; PONTE, 1993).

Dentre as doenças causadas por fungos, destacam-se o “tombamento de mudinhas” e as murchas causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *F. solani* e fungos do gênero *Phytophthora*. (SANTOS FILHO e SANTOS, 2003). Tais doenças são de difícil controle, pois os agentes causais se encontram no solo. Para esses casos, a utilização de mudas obtidas por enxertia em porta-enxertos resistentes é aconselhada. Na maior parte do sudeste da Flórida, Estados Unidos, é impossível plantar o maracujá-roxo sem este estar enxertado em maracujazeiro-amarelo ou em outra espécie resistente (KNIGHT JR e SAULS, 1994)

Dessa forma, ainda são necessários trabalhos que visem a obtenção de plantas com alto vigor, resistência ou tolerância a pragas (lagartas, percevejos e mosca das frutas) e a doenças (murcha prematura da planta devido a fungos, *Fusarium* e *Phytophthora*, principalmente), adaptação ampla, frutos grandes, alto teor de suco, coloração amarela dourada do suco, alto teor de sólidos solúveis e de acidez e resistência ao transporte e ao armazenamento (OLIVEIRA e FERREIRA, 1991).

Nesse sentido, estudos com diversas espécies selvagens de *Passiflora* têm sido realizados tendo em vista a avaliação desses materiais quanto à resistência a pragas e doenças e compatibilidade como porta-enxerto, dentre elas: *P. alata*, *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. foetida*, *P. giberti*, *P. nítida* e *Passiflora* sp. (KLEIN et al., 1984; STENZEL e CARVALHOS, 1992; MENEZES et al., 1994; LIMA et al., 1999).

Dentre essas espécies, *P. cincinnata* Mast. tem recebido a atenção de pesquisadores devido a resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* f.

sp. *passiflorae* (SÃO JOSÉ, 1994). Ao comparar o desempenho dos diversos porta-enxertos, verificou-se que as maiores percentagens de pegamento foram obtidas em *P. cincinnata* e *P. caerulea* (LIMA et al., 1999).

A utilização de enxertia pode ser uma estratégia interessante não apenas para contornar problemas decorrentes de patógenos encontrados no solo, mas também como estratégia para obtenção de pomares com plantas mais homogêneas, derivadas de genótipos agronomicamente superiores. Entretanto, problemas como a baixa taxa de germinação de sementes de espécies selvagens utilizadas como porta enxerto, o custo de produção e a qualidade fitossanitária das mudas, demonstram a necessidade de maiores pesquisas relacionadas à influencia do porta-enxerto sobre o desenvolvimento e produção do enxerto.

A cultura de tecidos pode ser uma ferramenta de grande valia tanto para programas de melhoramento quanto para a propagação de genótipos agronomicamente superiores, bem como para a produção de mudas francas, porta-enxertos e mudas enxertadas com alta qualidade fitossanitária. Sabe-se, todavia, que a técnica de cultura de tecidos *in vitro* depende de um controle externo da morfogênese feito por meio de fatores químicos, particularmente reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (BIONDI et al., 1998; KUMAR et al., 1998).

A principal via de regeneração para diversas espécies de *Passiflora* tem sido relatada como a organogênese, dentre elas *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. molissima*, *P. giberti*, *P. amethystina* e *P. caerulea* (MORAN ROBLES, 1978, 1979; DORNELAS e VIEIRA, 1994; APPEZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; OTAHOLA, 2000; REIS, 2001; REIS et al. 2003; BECERRA et al., 2004; MONTEIRO, 2005). A organogênese adventícia em maracujá é, via de regra, direta e ocorre na superfície dos explantes. Todavia, a embriogênese somática para maracujazeiro foi relatada apenas por via de culturas de células em suspensão e de protoplastos derivados de suspensões celulares de *P. giberti* (OTONI 1995; ANTHONY et al., 1999).

A cauligênese, em geral, é obtida em presença de citocininas, às vezes combinadas a uma auxina. A rizogênese é promovida por auxinas isoladamente. E por sua vez, a introdução *in vitro* de ápices caulinares provenientes de material

juvenil dispensa a adição de reguladores de crescimento (SCORZA e JANICK, 1976; MORAN ROBLES, 1978, 1979; SCORZA e JANICK, 1980; DREW, 1991; DORNELAS e VIEIRA, 1994; FARIA e SEGURA, 1997a; BARBOSA, 1999; APEZZATO-DA-GLORIA et al., 1999; PASSOS, 1999; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; BIASI et al., 2000; REIS, 2001).

Apesar de ser uma espécie que apresenta elevado potencial de resposta morfogênica *in vitro*, vários problemas têm sido detectados desde a dificuldade de germinação *in vitro* de sementes (PASSOS, 1999; HALL et al., 2000) até a desuniformidade de respostas em termos de regeneração. Essa última característica é, possivelmente, decorrente do modo de reprodução da espécie, que privilegia a alogamia.

Contudo, até o presente, não se tem notícia de protocolos de propagação *in vitro* economicamente viáveis, embora tenham sido realizados estudos com esse objetivo (KANTHARAJAH e DODD, 1990; KAWATA et al., 1995; FARIA e SEGURA, 1997b). Isso torna as investigações acerca das condições de cultivo *in vitro* ainda necessárias, pois os resultados obtidos até o momento ainda estão aquém dos esperados para um sistema de micropropagação economicamente viável ou de transformação genética eficiente. Além disso, as investigações têm se concentrado quase que exclusivamente em *P. edulis f. flavicarpa* e em *Passiflora edulis*.

Além de ser uma cultura economicamente importante no mundo, a ocorrência de atividade sedativa e ansiolítica ou a caracterização de flavonóides também vem sendo relatada em vários trabalhos envolvendo espécies desse gênero, como, por exemplo, em *P. incarnata* (RAFFAELLI, et al., 1997; SOULIMANI et al., 1997; ZANONI et al., 2000), o que torna ainda mais relevante os estudos nesse gênero.

Isso se reflete no crescente número de trabalhos e pesquisas envolvendo os vários aspectos da cultura de tecidos em *Passiflora*, desde aspectos básicos da regeneração *in vitro* (MORAN ROBLES, 1978, 1979; DREW, 1991; FARIA e SEGURA, 1997a, 1997b; DORNELAS e VIEIRA, 1993; BARBOSA, 1999; BARBOSA et al. 2001; BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; HALL et al., 2000) e de estabelecimento de suspensões celulares (OTONI, 1995; PASSOS 1999), a obtenção de haplóides via androgênese ou ginogênese e poliploidização *in vitro* (RÊGO, 2001), de isolamento e cultivo de protoplastos

(D'UTRA VAZ et al., 1993; DORNELAS e VIEIRA, 1993; DORNELAS, 1995; VIEIRA e DORNELAS, 1996; ANTHONY et al., 1999), de hibridação somática (DORNELAS et al., 1995; OTONI, 1995; OTONI et al., 1995) até a transformação genética (MANDERS et al., 1994; OTONI 1995; OTONI et al., 1996; SILVA 1998; BRAZ, 1999; HALL et al., 2000; ALFENAS et al., 2005; MONTEIRO, 2005). Um dos principais objetivos tem sido o de maximizar protocolos de cultura de tecidos visando a posterior introgressão de genes oriundos de plantas silvestres para as cultivadas, via métodos biotecnológicos (DORNELAS, 1995; OTONI, 1995; OTONI et al., 1995; PASSOS, 1999).

Métodos de biotecnologia têm sido indicados para complementar certos programas de melhoramento. No caso específico do maracujazeiro, a transgenia se apresenta como um caminho viável para a obtenção de variedades resistentes (MONTEIRO, 2005; ALFENAS et al., 2005). O protocolo de transformação genética mais comumente utilizado em *Passiflora* é o mediado por *Agrobacterium* (MANDERS et al., 1994; OTONI, 1995; SILVA, 1998; BRAZ, 1999; MONTEIRO, 2005). Todavia, diversos problemas ainda persistem, como o pequeno número de ramos gerados por explante, a baixa eficiência de transformação e o alto número de escapes produzidos.

Dessa forma, o pleno conhecimento e o domínio das técnicas de cultura de tecidos e de morfogênese *in vitro* para o gênero serão de grande importância no desenvolvimento de estudos de clonagem, caracterização e incorporação de genes relacionados à resistência a viroses, bacterioses e, sobretudo, dos genes envolvidos no controle do processo de maturação dos frutos, pela manipulação de genes envolvidos na biossíntese do etileno, além daqueles envolvidos na produção de metabólitos secundários.

No presente trabalho, estudos relacionados a diversos aspectos da morfogênese e do comportamento *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* e de *P. cincinnata* foram realizados. Foram conduzidos experimentos acerca da influência de diversos fatores que interferem no cultivo *in vitro*, como a combinação de reguladores de crescimento e de tipos de agentes gelificantes, além de estudos relacionados à viabilidade de protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, bem como a atividade dos antibióticos Canamicina e Higromicina como agentes seletivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, P.F., BRAZ, A.S.K., TORRES, L.B., ZERBINI, F.M. & OTONI, W.C. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.33-38, 2005.
- ANTHONY, P., OTONI, W.C., POWER, J.B., LOWE, K.A.C., DAVEY, M.R. Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R.D. (ed.) **Methods in Molecular Biology, v.111: Plant Cell Culture Protocols**. Humana Press Inc., London, 1999. p.169-181.
- APEZZATO-DA-GLORIA, B., VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 70 p. (Tese de Mestrado).
- BARBOSA, W.M., OTONI, W.C., CARNELOSSI, M., SILVA, E., AZEVEDO, A.A., VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v.7, p.47-51, 2001.
- BECERRA, D.C., FORERO, A.P., GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.87-90, 2004.
- BIASI, L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.
- BIONDI, S., SCARAMAGLI, S., CAPITANI, F., MARINO G., ALTAMURA, M. M., TORRIGIANI, P. Ethylene involvement in vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, v.202, p.134-144, 1998.

- BRAZ, A.S.K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 106p. (Tese de Mestrado).
- BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R., BRUCKNER, C.H., MANICA, I., HOFFMANN, M. (Eds.). **Maracujá: temas selecionados (1):** melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p.7-24.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** 2.ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- DORNELAS, M.C. **Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995. 182p. (Tese de Mestrado).
- DORNELAS, M.C., TAVARES, F.C.A., OLIVEIRA, J.C., VIEIRA, M.L. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v.15, p.106-110, 1995.
- DORNELAS, M.C., VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.
- DORNELAS, M.C., VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.
- D'UTRA VAZ, F.B., SANTOS A.V.P, MANDERS, G., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical wood plant, passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.
- FARIA, L.C., SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.33, p.209-212, 1997a.
- FARIA, L.C., SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, p.1276-1277, 1997b.
- GRATTAPAGLIA, D., CALDAS, L.S., SILVA, J.R., MACHADO, M.A. cultura de tecidos de maracujá. In: SÃO JOSÉ, A.R., FERREIRA, F.R., VAZ, R.L. (Coords.). **A cultura do maracujá no Brasil.** Jaboticabal: Funep, 1991. p.61-77.

- HALL, R.M., DREW, R.A, HIGGINS, C.M., DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an australian passion fruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v.48, p.673-680, 2000.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Culturas temporárias e permanentes, **Produção Agrícola Municipal**, v.30, p.1-93, 2003.
- KANTHARAJAH, A.S., DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, p.337-339, 1990.
- KAWATA, K., USHIDA, C., KAWAI, F., KANAMORI, M., KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.281-284, 1995.
- KLEIN A.L., FERRAZ, L.C.C.B., OLIVEIRA, J.C. Comportamento de diferentes maracujazeiros em relação ao nematóide formador de galhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 19, p. 207-209, 1984.
- KNIGHT JR R.J., SAULS, J.W. **The Passion Fruit**. University of Florida: Florida Cooperative Extension Service, 1994. 5 p.
- KUMAR, P.P., LAKSHMANAN, P., THORPE, T.A. Review: Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.34, p.94-103, 1998.
- LIMA A.A., CALDAS, R.C., CUNHA, M.A.P.D.C., SANTOS FILHO, H.P. Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura** 21, p. 318-321, 1999.
- LOMBARDI, S.P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* Mast.**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. 60p. (Tese de Mestrado).
- MANDERS, G., OTONI, W.C., D'UTRA VAZ, F.B., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Transformation of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.234-8, 1994.
- MANICA, I. Maracujazeiro: taxonomia -anatomia - morfologia. In: SÃO JOSÉ, A.R., BRUCKNER, C.H., MANICA I., HOFFMANN, M. (Eds.). **Maracujá: temas selecionados (1):** melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p.7-24.
- MARTIN, F.W., NAKASONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany**, v.24, p.333-343, 1970.
- MELETTI, L., MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 64 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**, v.22, p. 95-104, 1994.
- MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 134p. (Tese de Doutorado).
- MONTEIRO, A.C.B.A., NAKAZAWA, G.T., MENDES, B.M.J., RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v.57, p.571-573, 2000.
- MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. molissima* Baley. **Fruits**, v.33, p.693-699, 1978.
- MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeudes de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v.29, p.224-228, 1979.
- OLIVEIRA J.C., FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In SÃO JOSÉ, A.R. et al., eds, **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: Funep, 1991. p. 211-239.
- OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, v.12, p.71-74, 2000.
- OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese de Doutorado).
- OTONI, W.C., BLACKHALL, N., D'UTRA VAZ, F.B., CASALI, V.W.D., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Somatic hybridization between *Passiflora* species, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.21, p.10-14, 1995.
- OTONI, W.C., CASALI, V.W.D., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Expressão transitória do gene *gus* em maracujazeiro (*Passiflora giberti* N.E. Brown) mediada pelo bombardeamento de partículas. **Revista Ceres**, v.43, p.326-335, 1996.
- PASSOS, I.R.S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999. 128p. (Tese de Doutorado).

- PIZA JÚNIOR, C.T. A cultura do maracujá na Região Sudeste do Brasil. In: RUGGIERO, C. (ed.) **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p.20 - 48.
- POCASANGRE-ENAMORADO, H.E., FINGER, F.L., BARROS, R.S., PUSCHMANN, R. Development and ripening of yellow passion fruit. **Journal of Horticultural Science**, v.70, p.573-576, 1995.
- PONTE J. As doenças do maracujá amarelo no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p. 11-14, 1993.
- RAFFAELLI, A., MONETI, G., MERCATI, V., TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v.777, p.223-231, 1997.
- RÊGO, M.M. **Indução *in vitro* de haplóides e de poliplóides e detecção molecular de alelos de auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 63p. (Tese de Doutorado).
- REIS, L.B. **Morfogênese *in vitro* de Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 89 p. (Tese de Mestrado).
- REIS, L.B., PAIVA-NETO, V.B., TOLEDO PICOLI, E.A., COSTA, M.G.C., RÊGO, M.M., CARVALHO, C.R., FINGER, F.L., OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.
- SANTOS FILHO, H.P., SANTOS, C.F. Doenças causadas por fungos. In SANTOS FILHO, H.P., JUNQUEIRA, N.T.V., eds, **Maracujá - Fitossanidade**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2003. p. 12-21.
- SÃO JOSÉ, A.R. Propagação do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R., FERREIRA, F.R., VAZ, R.L (Eds.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1991. 247p.
- SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994, 255p.
- SCORZA, R., JANICK, J. Tissue culture in *Passiflora*. **24th Annual congress of the American Society for Horticultural Sciences, Tropical Region**. Puerto Rico, 1976. p.179-183.
- SCORZA, R., JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p.892-897, 1980.

- SHIOMI, S., WAMOCHO, L.S., AGONG, S.G. Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine. **Postharvest Biology and Technology**, v.7, p.161-170, 1996a.
- SHIOMI, S., KUBO, Y., WAMOCHO, L.S., KOAZE, H., NAKAMURA, R., INABA, A. Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.8, p.199-207, 1996b.
- SILVA, M.B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 45p. (Tese de Mestrado).
- SOULIMANI, R., YOUNOS, C., JARMOUNI, S., BOUSTA, D., MISSLIN, R., MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.11-20, 1997.
- SOUZA, J.S., CARDOSO, C.E.L., LIMA, A.A., COELHO, E.F. Aspectos socioeconômicos. In: LIMA, A.A. (Ed.). **Maracujá Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia, 2002. p.10.
- STENZEL N.M.C., CARVALHOS, S.L.C. Comportamento do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) enxertados sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura** 14, p. 183-186, 1992.
- TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: 1994. p.1-142.
- VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (passion fruit). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1996. v.38, p.108-119.
- ZANOLI, P., AVALLONE, R., BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chysin. **Fitoterapia**, v.71, p.117-123, 2000.

CAPÍTULO I

Regeneração *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Masters via organogênese e embriogênese

1. INTRODUÇÃO

Dentre as etapas da propagação *in vitro*, a introdução de material vegetal *in vitro* é um requisito fundamental, sendo muitas vezes um fator limitante para o estabelecimento de um novo protocolo de cultivo *in vitro*. Nesse sentido, a germinação *in vitro* de maracujazeiro têm possibilitado a obtenção de grandes quantidades de material asséptico, abrindo também a possibilidade de cultivo *in vitro* para outras espécies do gênero, principalmente aquelas selvagem (REIS, 2001; ALEXANDRE, 2002; COUCEIRO, 2002; MONTEIRO, 2005).

Passiflora cincinnata Masters é uma liana glabra ou levemente pilosa, de caule cilíndrico. As folhas são palmatipartidas e apresentam um par de glândulas peciolares. As flores apresentam sépalas de cor verde na face externa e azul-rosada ou violeta na face interna; as pétalas apresentam as mesmas cores da face interna das sépalas; os filamentos da coroa apresentam a parte inferior púrpura, meio listrado de azul-rosado e azul-pálido, e a parte superior azul-pálido ou escuro. O fruto tem formato globoso ou ovóide (CUNHA *et al.*, 2002). A espécie tem distribuição ampla na América do Sul, do leste do Brasil até o oeste da Bolívia (KILLIP, citado por NUNES e QUEIROZ, 2001). No Brasil ocorre desde o Pará até São Paulo, sendo freqüente em locais perturbados pela ação antrópica, florescendo durante quase todo o ano (NUNES e QUEIROZ, 2001).

O interesse em *P. cincinnata* tem aumentado devido o fato dessa espécie ser resistente à doença bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae* (NETO *et al.*, citados por OLIVEIRA e FERREIRA, 1991), sendo também um porta-enxerto compatível com o maracujazeiro-

amarelo, apresentando grande eficiência de pegamento (STENZEL e CARVALHO, 1992; LIMA et al, 1999).

Apesar da gama de trabalhos de cultura de tecidos com o gênero *Passiflora*, aqueles envolvendo *P. cincinnata* são restritos à regeneração a partir de protoplastos (CARNEIRO e VIEIRA, 1993), à organogênese *in vitro* (LOMBARDI, 2003) e à cultura a partir de sementes maduras (GUZZO et al., 2004). Porém, em nenhum desses trabalhos utilizou-se explantes hipocotiledonares ou avaliou-se a influência de agentes gelificantes na regeneração *in vitro*.

A influência do tipo de agente gelificante ou da concentração utilizada na cultura de tecidos já é bastante clara e vem sendo documentada para várias espécies, diferentes vias regenerativas e tipos de explantes como em *Fraxinus angustifolia* (TONON et al., 2001); *Picea mariana* e *P. rubens* (TREMBLAY e TREMBLAY, 1991); *Syzygium alternifolium* (SHA VALLI KHAN et al., 1999); *Juglans regia* (SAADAT e HENNERTY, 2002); *Rosa hybrida* cv. 'Motrea', *Lilium* cv. 'Enchantment' e *Sulcorebutia alba* (SCHOLTEN e PIERIK, 1998a e 1998b); *Rosa chinensis minima* e *Gladiolus* sp. cv. "Nova lux" (NEŠŤÁKOVÁ et al., 2000); e *P. edulis* f. *flavicarpa* (REIS, 2001).

A escolha do agente gelificante deve ser feita de maneira criteriosa, pois este pode interferir decisivamente no sucesso de um protocolo de cultivo *in vitro*. Entretanto, a sua escolha é feita, na maioria das vezes, baseada apenas na sua disponibilidade e no preço (DEBERGH, 1983). A resposta pode não apenas variar de espécie para espécie, mas também entre genótipos de uma mesma espécie. Em girassol, a interação entre agente gelificante e genótipo teve papel decisivo na habilidade regenerativa (BERRIOS et al., 1999).

A principal via de regeneração para diversas espécies de *Passiflora* tem sido relatada como a organogênese, como observado para *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. molissima*, *P. giberti*, *P. amethystina* e *P. caerulea* (MORAN ROBLES, 1978, 1979; DORNELAS e VIEIRA, 1994; APPEZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; OTAHOLA, 2000; REIS, 2001; REIS et al. 2003; BECERRA et al., 2004; MONTEIRO, 2005). A embriogênese somática para maracujazeiro

foi obtida apenas a partir de culturas de células em suspensão e de protoplastos derivados de suspensões celulares de *P. giberti* (OTONI 1995; ANTHONY et al., 1999).

O presente trabalho objetivou avaliar a germinação *in vitro* mediante retirada total do tegumento das sementes e a obtenção de plântulas regeneradas via organogênese adventícia e embriogênese somática, bem como a avaliação da influência de diversos agentes gelificantes na organogênese adventícia em explantes hipocotiledonares de *P. cincinnata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Germinação

Foram utilizadas sementes de *Passiflora cincinnata* fornecidas pelo Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. Após a extração manual, as sementes foram postas para fermentar em recipiente plástico, à temperatura ambiente, por um período de três dias (TSUBOI e NAKAGAWA, 1992). As sementes foram friccionadas com areia lavada até a total retirada dos arilos e da mucilagem das sementes, sendo colocadas para secar sobre papel-toalha, à sombra, em condições de laboratório, por 3 dias.

Para a germinação, o tegumento das sementes foi removido com auxílio de mini-morsa (REIS, 2001). A amêndoa foi desinfestada em etanol 70° GL por 15 segundos e em água sanitária comercial mais Tween 20 a 0,01% (v/v) por 10 min, seguida de quatro enxágües em água deionizada autoclavada.

Os meios utilizados para germinação foram compostos por sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), na concentração normal (MS) ou na metade da concentração (MS ½F), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l⁻¹ de mio-inositol e 20 g l⁻¹ de sacarose. Foram utilizados 2,5 g l⁻¹ de Phytigel (Sigma Chemical Company, USA) como agente gelificante, sendo 10 ml de meio vertidos em tubos de ensaio (25 x 150 mm), os quais foram vedados com tampa de polipropileno. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e autoclavado por 15 min a 121 °C e pressão de 1,1 atm.

Duas sementes foram inoculadas por tubo, sendo as culturas mantidas no escuro por 15 dias, em estufa incubadora (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de 27 ± 2 °C, para germinação e estiolamento. Após esse período, a germinação das sementes foi avaliada, sendo contadas as sementes com germinação normal, anormal, não germinadas e contaminadas. Quarenta tubos foram utilizados para cada meio de cultura e os experimentos foram repetidos ao menos três vezes.

Após avaliação, as culturas foram transferidas para sala de cultura e mantidas por outros 15 dias a temperatura de 26 ± 2 °C, sob irradiância de cerca de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) e fotoperíodo de 16 h, para enverdecimento.

2.2. Regeneração *in vitro*

Foram utilizados segmentos de hipocótilos com aproximadamente 10 mm de comprimento, oriundos de plântulas germinadas em condições assépticas (item 2.1) e enverdecidas por 15 dias.

Experimentos preliminares foram realizados para determinação da melhor combinação de reguladores. Os explantes foram inoculados em meio de regeneração constituído de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l^{-1} de mio-inositol e 30 g l^{-1} de sacarose, acrescido de diversas combinações de reguladores de crescimento, sendo os tratamentos utilizados: **I-** $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP); **II-** 1 mg l^{-1} de BAP; **III-** $\frac{1}{2}$ Drew, reguladores utilizados por DREW (1991): $2,15 \text{ mg l}^{-1}$ de cinetina, $4,15 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP e $0,88 \text{ mg l}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolacético), na metade dessas concentrações; **IV-** Drew; **V-** $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de zeatina; **VI-** 1 mg l^{-1} de zeatina; **VII-** $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP + 10% v/v de água de coco (AC); **VIII-** $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP + 1 mg l^{-1} de ácido giberélico.

Num segundo experimento foram utilizadas as seguintes combinações: **a-** sem adição de reguladores de crescimento; **b-** 0,25 mg l⁻¹ de BAP; **c-** 0,5 mg l⁻¹ de BAP; **d-** 1 mg l⁻¹ de ácido giberélico; **e-** 0,25 mg l⁻¹ de BAP + 1 mg l⁻¹ de ácido giberélico; **f-** 10% (v/v) de AC; **g-** 0,25 mg l⁻¹ de BAP + 10 % (v/v) de AC; 1/10 Drew.

O meio foi gelificado com 2,5 g l⁻¹ de Phytigel™ (Sigma Chemical Company, USA) e teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A água de coco e as soluções de AIA e de ácido giberélico foram esterilizadas em filtro Millex-GS com poros de 0,22µm de diâmetro (Millipore, USA), sendo adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem (15 min a 121°C e pressão de 1,1 atm).

A avaliação foi realizada aos 28 dias de cultivo, quando foram quantificados a frequência de regeneração e o número de ramos por explante, sendo considerados apenas aqueles com comprimento maior ou igual a 3 mm.

Os agregados embriogênicos foram recultivados em meio MS (conforme descrito no item **2.2**), sem adição de reguladores de crescimento. Após 15 dias da germinação dos embriões, as plântulas resultantes foram aclimatadas em copos plásticos de 50 ml contendo substrato vegetal Plantmax (Eucatex, Brasil), sendo mantidas cobertas com saco plástico transparente por 15 dias.

Cada combinação de reguladores foi considerada um tratamento, o qual foi composto por cinco placas de Petri de 60 x 15 mm, contendo cinco explantes. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e cada experimento foi repetido ao menos uma vez.

2.3. Influência de agentes gelificantes sobre regeneração *in vitro*

Segmentos de hipocótilo foram inoculados em meio de regeneração (item **2.2**) acrescido de 0,5 mg l⁻¹ de BAP e 10% (v/v) de AC e gelificado com os seguintes agentes gelificantes: 2,5 g l⁻¹ de Phytigel™ (Sigma Chemical Company, USA), 5,8 g l⁻¹ de Agargel™ (Sigma Chemical Company, USA), 7,5 g l⁻¹ de “Agar Purified” (Sigma Chemical Company, USA), 5 g l⁻¹ de agar-agar (Merck, Germany) ou 8 g l⁻¹ de ágar (Vetec Química Fina Ltda, Brasil). Após 15

dias, os explantes foram recultivados em meio recém-preparado, contendo a metade da concentração original de BAP.

Cada agente gelificante foi considerado um tratamento, o qual foi composto de 8 placas de Petri de 60 x 15 mm, contendo cinco explantes. Sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi repetido uma vez.

A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo, quando foram quantificados ao número de explantes apresentando ramos e/ou gemas (frequência de regeneração) e o número de ramos por explante, sendo considerados apenas aqueles com comprimento maior ou igual a 3 mm.

2.4. Enraizamento de ramos regenerados *in vitro*

Ramos regenerados nos diversos experimentos foram individualizados e inoculados em meio constituído de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), na metade da concentração normal, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l⁻¹ de mio-inositol e 20 g l⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem, sendo gelificado com 2,5 g l⁻¹ de Phytigel. Concentrações de 0, 0,293, 0,44, 0,88 e 1,76 mg l⁻¹ de AIA foram acrescidas ao meio após autoclavagem (15 min a 121°C e pressão de 1,1 atm), durante o processo de resfriamento. O meio foi vertido em tubos de ensaio (25 x 150 mm). A solução de AIA foi esterilizada por meio de filtro Millex-GS com poros de 0,22µm de diâmetro (Millipore, USA). Aos 15 dias da inoculação os explantes foram recultivados em meio novo.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, onde cada concentração de AIA foi considerada um tratamento, os quais foram compostos de 10 tubos de ensaio contendo um ramo individualizado, com comprimento médio de 10 mm. O experimento foi avaliado aos 30 dias quanto ao número de ramos com raízes e o aspecto geral da parte aérea dos mesmos.

3. RESULTADOS

3.1. Germinação

A germinação em meio MS na sua força total foi melhor, quanto ao aspecto geral das plântulas, que a obtida meio em MS ½F Ligeira melhora na produção de plântulas morfológicamente normais, bem como queda no número de sementes com germinação anormal e de sementes não germinada foi observada, embora não tenha sido verificada diferença estatística nas características objetivamente avaliadas (Figura 1). O método de desinfestação utilizado foi bastante eficiente, com contaminação variando de 0 a 15 %.

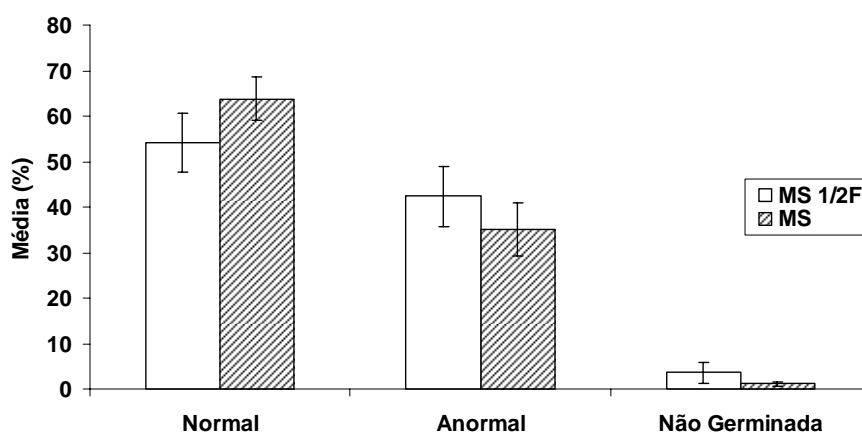


Figura 1 – Porcentagem média de germinação normal, anormal e de sementes não germinadas de *Passiflora cincinnata* escarificadas e cultivadas em meio MS e MS ½ F. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

3.2. Regeneração *in vitro*

De forma geral, a frequência de regeneração (FR) se mostrou elevada nos tratamentos realizados no primeiro experimento (meios I a VIII), com exceção dos tratamentos com zeatina (V e VI) (Figura 2A). As maiores médias de ramos por explante foram observadas nos tratamentos que continham $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP (I, VII e VIII) (Figura 2C). A adição de AC (tratamento VII) ao meio de cultura causou melhoria na qualidade dos ramos gerados, que foram mais alongados que nos demais tratamentos. Apesar da adição do GA_3 (tratamento VIII) ter efeito semelhante à adição de AC, esse tratamento gerou respostas mais variáveis, como indicado pelo desvio padrão (Figura 2C, tratamentos VII e VIII).

A redução na concentração de BAP testada no segundo experimento não incrementou a geração de ramos, embora a FR tenha sido alta, como exceção dos tratamentos **a**, **d** e **f** (Figura 2B e D). O tratamento **h** gerou grande número de gemas, superior aos demais tratamentos. Contudo, essas gemas, em sua maioria, não se alongaram, resultando em um baixo número de ramos por explante.

A água de coco isoladamente (tratamento **f**) não foi eficiente na indução de gemas, com baixa FR e número de ramos formados (Figura 2B e D). A maioria dos explantes inoculados ($72 \pm 9,6\%$) nesse meio de cultura apresentava formação de calejamento e $10 \pm 3,5\%$ dos ramos apresentavam raízes.

Os explantes do tratamento **f** foram mantidos por mais 30 dias no mesmo meio, sem recultivo. Ao final desse período, estruturas embriogênicas (Figura 3A e B) e embriões já em fase cotiledonar foram observados (Figura 3C). Após recultivo em meio novo, os calos embriogênicos continuaram formando embriões e embriogênese secundária também foi observada com bastante frequência (Figura 3D).

Os agregados embriogênicos (Figura 3E) mostraram-se bastante proliferativos, sendo obtida germinação normal de embriões em meio MS, sem a adição de reguladores (Figura 3F). Plântulas obtidas desses embriões foram aclimatadas (Figura 3G).

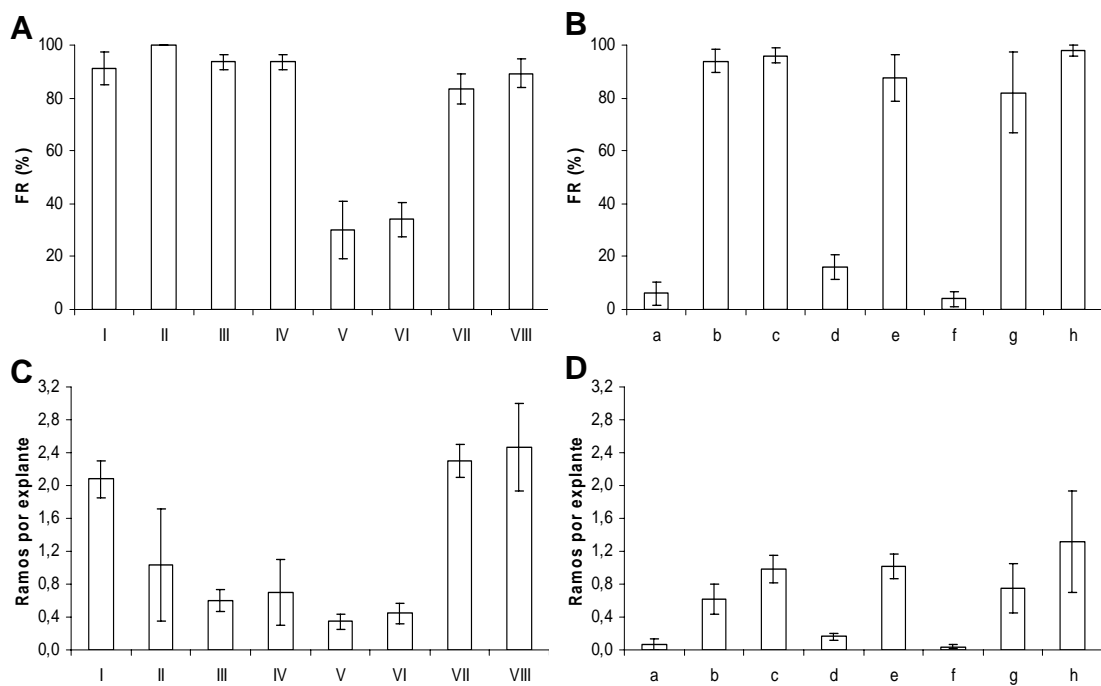


Figura 2 – Resposta morfogênica de segmentos de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* tratados com diversas combinações de reguladores de crescimento. **A e B**- Frequência de regeneração (FR). **C e D**- Número médio de ramos por explante. Tratamentos: **I**- 0,5 mg l⁻¹ de BAP; **II**- 1 mg l⁻¹ de BAP; **III**- ½ Drew; **IV**- Drew; **V**- 0,5 mg l⁻¹ de zeatina; **VI**- 1 mg l⁻¹ de zeatina; **VII**- 0,5 mg l⁻¹ de BAP + 10% (v/v) de AC; **VIII**- 0,5 mg l⁻¹ de BAP + 1 mg l⁻¹ de ácido giberélico; **a**- sem regulador de crescimento; **b**- 0,25 mg l⁻¹ de BAP; **c**- 0,5 mg l⁻¹ de BAP; **d**- 1 mg l⁻¹ de GA₃; **e**- 0,25 mg l⁻¹ de BAP + 1 mg l⁻¹ de GA₃; **f**- 10% (v/v) de AC; **g**- 0,25 mg l⁻¹ de BAP + 10% (v/v) de AC; **h**- 0,1x Drew. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

3.3. Influência de agentes gelificantes sobre regeneração *in vitro*

A FR obtida na avaliação da influência dos agentes gelificantes foi da ordem de 70 a 80%, com exceção para o ágar Sigma, que teve FR menor, 52,5% (Figura 4 A). Desempenho inferior dessa marca de ágar também foi verificado em relação ao número médio de ramos por explante (Figura 4 B). Phytigel, Gelrite, juntamente com ágar Sigma, não foram eficientes na indução de ramos. Agargel e ágar Vetec tiveram os melhores desempenhos nesse quesito. O alongamento dos ramos foi de forma geral satisfatório em todos os agentes gelificantes, com comprimento médio ficando entre 6,4 mm para Gelrite e 10,3 mm para Agargel, pior e melhor desempenho, respectivamente (Figura 4 C). O aspecto geral das culturas pode ser observado na Figura 5.

Foi observado, ao final de 30 dias, que o meio de cultura gelificado com ágar Vetec apresentou consistência líquida nas repetições onde o crescimento dos ramos foi mais intenso (3 das 8 repetições), semi-líquido nas placas com crescimento intermediário e com a consistência original nas repetições onde a regeneração e crescimento dos ramos foram menores. O pH do meio das repetições em que este se liquefez foi de 5,2, 5,3 e 5,4. O pH do meio que estava semi-líquido foi de 5,91.

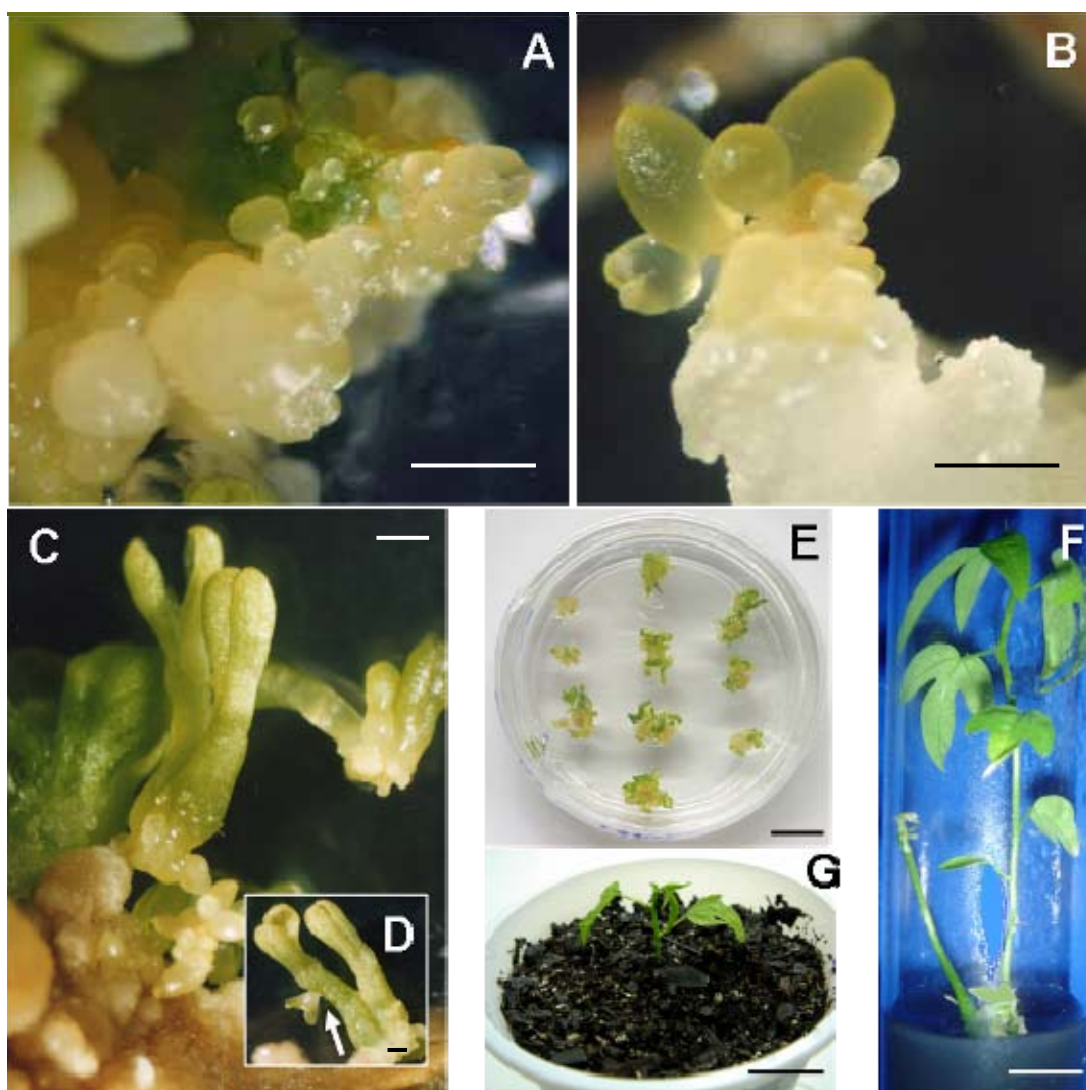


Figura 3 – Aspecto de embriões formados em segmento de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* inoculados em meio de regeneração com 10% (v/v) de água de coco (meio F). **A-** Aspecto de estruturas pró-embriogênicas. **B-** Embriões globulares **C-** Embriões em diversas fases. **D-** Embrião da foto C apresentando embriogênese secundária (seta). **E-** Agregados embriogênicos em multiplicação. **F-** Plântula alongada **G-** Planta em aclimação. As barras correspondem a 1 mm (A-D) e 10 mm (E-G).

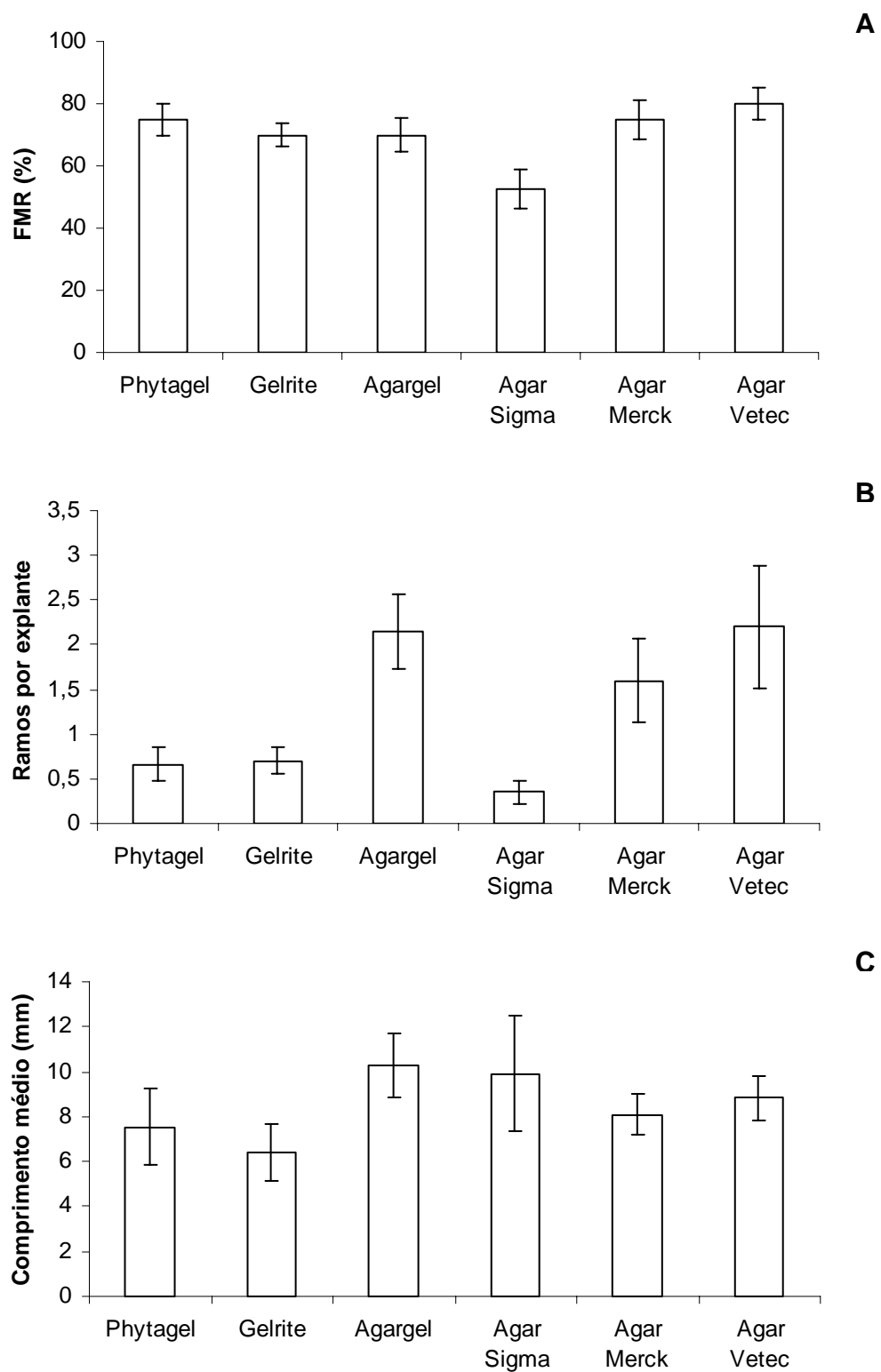


Figura 4 – Influência de diversos agentes gelificantes sobre a morfogênese *in vitro* de segmentos de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A**- Freqüência de regeneração (FR). **B**- Número médio de ramos por explante. **C**- Comprimento médio dos ramos. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

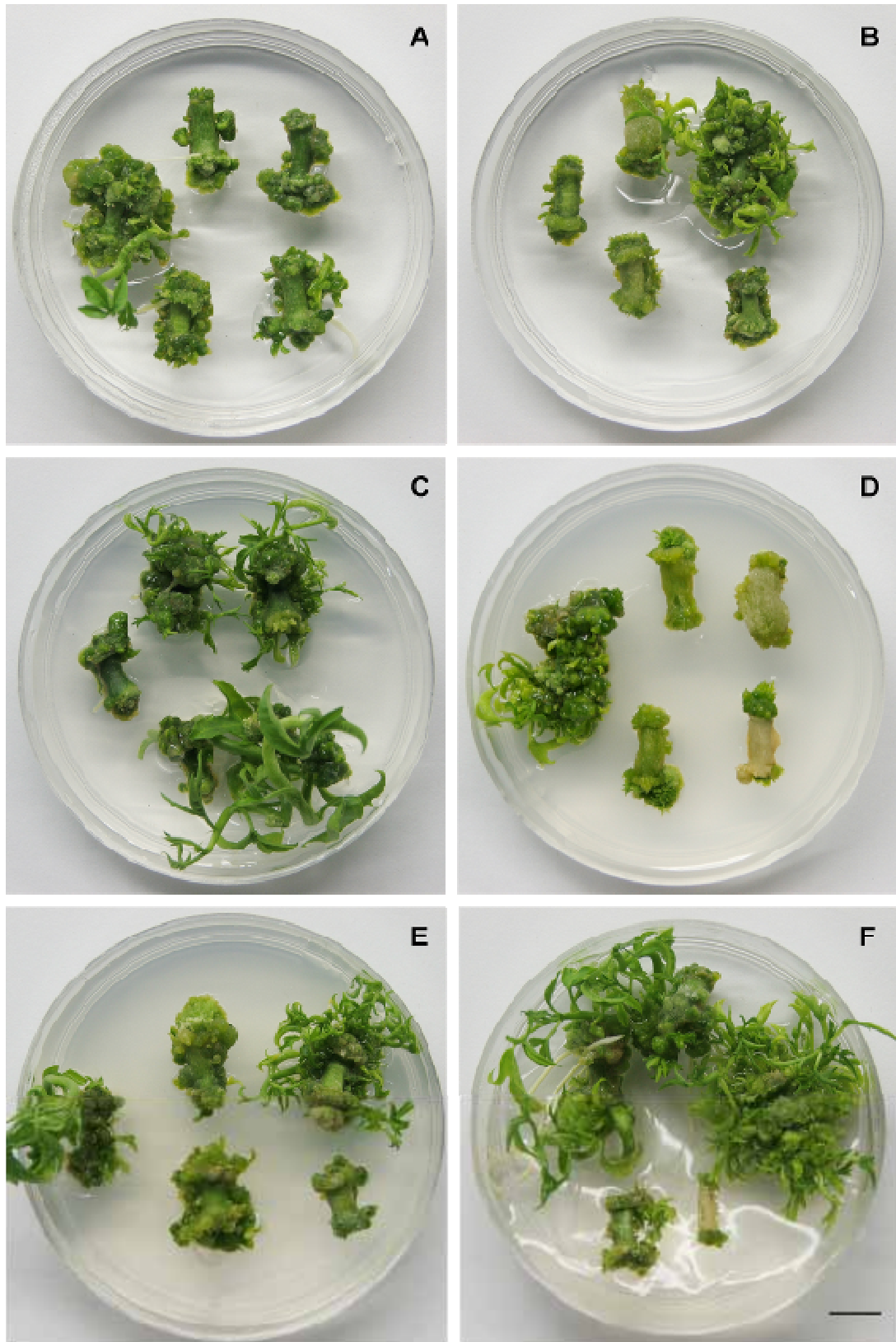


Figura 5 – Aspecto geral de segmentos de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* cultivados em meio de regeneração gelificado com diversos agentes gelificantes. **A-** Phytigel; **B-** Gelrite; **C-** Agargel; **D-** Ágar Sigma; **E-** Ágar Merck; **F-** Ágar Vetec. A barra corresponde a 10 mm.

3.4. Enraizamento de ramos regenerados *in vitro*

A indução de raízes em ramos regenerados não foi satisfatória. O melhor resultado foi obtido no tratamento com $0,44 \text{ mg l}^{-1}$ de AIA, onde 30% dos ramos apresentavam de 1 a 3 raízes. No tratamento com $0,293 \text{ mg l}^{-1}$ de AIA foi verificado um melhor desenvolvimento da parte aérea dos ramos. Um aspecto geral dos tratamentos pode ser visto na Figura 6. Os explantes apresentavam-se mais intumescidos na base, conforme a concentração de AIA foi aumentada.

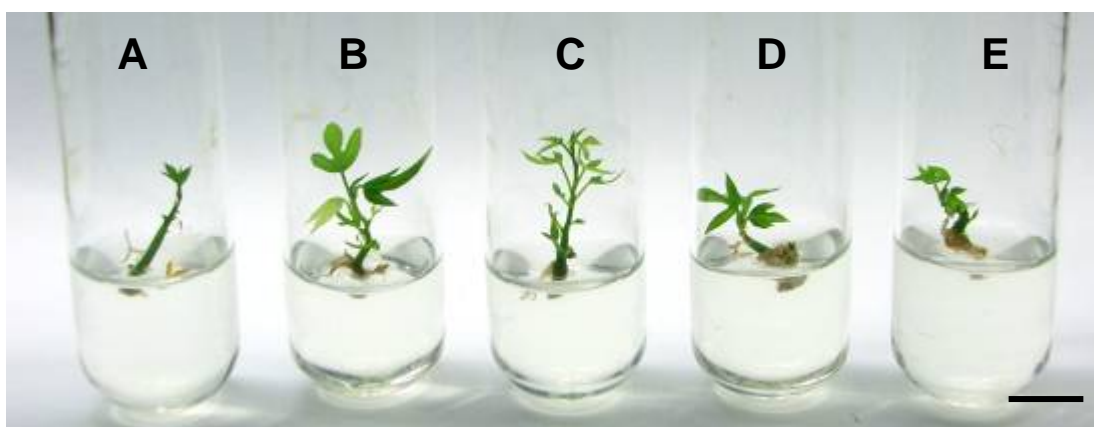


Figura 6 – Ramos de *Passiflora cincinnata* regenerados tratados com concentrações de (A) 0, (B) 0,293, (C) 0,44, (D) 0,88 e (E) $1,76 \text{ mg l}^{-1}$ de AIA. A barra corresponde a 10 mm.

4. DISCUSSÃO

A dificuldade em germinar sementes de maracujazeiro *in vitro*, assim como a grande incidência de contaminação em material proveniente de casa de vegetação já foi relatada anteriormente para o gênero (HALL et al., 2000). Não há muitos dados sobre porcentagem de germinação *in vitro* para o gênero *Passiflora*. Em *P. nítida* obteve-se 19,7% de germinação (PASSOS, 1999); em *P. edulis*, sementes não escarificadas não germinaram e das sementes que foram escarificadas, apenas 20% tinham condições de serem utilizadas nos experimentos (BIRICOLTI e CHIARI, 1994). O cultivo de embriões e a regeneração de plantas a partir de endosperma foram obtidos para uma série de espécies do gênero, inclusive *P. cincinnata* (MOHAMED et al., 1996; GUZZO et al., 2004). Contudo, de 62 espécies de *Passiflora* testadas, foram obtidas culturas *in vitro* para 29 espécies, com regeneração de plantas para apenas 13 dessas espécies.

Para a introdução de material *in vitro*, o método de retirada do tegumento é uma opção bem mais interessante e se mostrou bastante viável em *P. cincinnata* devido ao fato do tegumento das sementes dessa espécie romper-se com bastante facilidade, liberando a amêndoa totalmente intacta, o que não ocorre em outras espécies do gênero como em *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. Apesar da maior dificuldade na retirada do tegumento de *P. edulis* f. *flavicarpa*, esse método tem proporcionado obtenção de germinação próxima a 50% (REIS, 2001). Para essa espécie, melhores resultados na germinação foram obtidos em meio MS contendo metade da concentração normal, o que contrasta com os resultados obtidos no presente trabalho para *P. cincinnata*, em que melhores resultados na germinação foram obtidos em meio de cultura com sais MS na sua força total. A

escarificação por corte nas laterais da semente proporcionou germinação da ordem de 52%, em trabalho realizado por LOMBARDI (2003). Esse resultado condiz com o obtido aqui para o meio MS ½F, uma vez que a autora utilizou essa mesma concentração de sais MS para germinação.

Até quatro sementes podem ser colocadas por tubo sem prejuízo na porcentagem de germinação ou do aspecto geral das plantas (dados não mostrados), gerando assim menores gastos com o preparo de meio de cultura e redução do espaço requerido para armazenamento das culturas.

A idade de explantes coltedonares de maracujazeiro influencia a frequência de explantes com ramos, bem como o número de ramos por explante (HALL et al., 2000). A idade das plântulas também influencia a resposta *in vitro* para explantes foliares de maracujazeiro, onde aquelas com dois meses de idade geraram maior número de ramos por explante (BECERRA et al., 2004). Além desse dado, esses autores observaram que plantas oriundas de casa de vegetação tiveram melhor desempenho que plantas cultivadas *in vitro* e que material proveniente de plantas adultas “revigorado” *in vitro*. O tempo de enverdecimento das plântulas também é um fator a ser considerado (REIS et al., 2001), uma vez que explantes obtidos de plântulas estioladas enverdecidas por um período de 30 dias têm mostrado melhores respostas *in vitro*.

A utilização de explantes de hipocótilo tem como vantagens o fácil manuseio e a grande quantidade de explantes obtidos a partir de plantas estioladas. Esse tipo de explante gera maior frequência de regeneração em relação ao obtido em explantes foliares (LOMBARDI, 2003), embora o número de gemas tenha sido menor. Entretanto, a avaliação dos explantes foliares foi realizada aos 56 dias de cultivo e a autora não faz referência ao tamanho das gemas consideradas na avaliação.

A diminuição da concentração de BAP de 0,5 para 0,25 mg l⁻¹ foi adotada no presente trabalho, pois a redução gradual na concentração de BAP tem se mostrado benéfica ao alongamento de ramos regenerados em maracujá. A permanência em altas doses de citocininas também tem sido relacionada à dificuldade de enraizamento subsequente (GEORGE, 1993). Contudo, o efeito dessa redução não foi de fato quantificado nos experimentos realizados.

A utilização de água de coco mostrou-se benéfica para a regeneração de *P. cincinnata*, como sugerido para outras espécies do gênero (KANTHARAJAH e DODD, 1989; CARNEIRO e VIEIRA, 1994; HALL et al., 2000). Entretanto, MANDERS et al. (1994), FARIA e SEGURA (1997), BARBOSA (1999), PASSOS (1999), OTAHOLA (2000) e REIS (2001) relataram a organogênese em maracujazeiro, na ausência de água de coco. Contudo, por se tratar de uma substância complexa e sujeita a variações, sua substituição por substâncias de composição conhecida é desejável. Os dados aqui obtidos indicam o GA₃ como uma alternativa. Novos experimentos devem ser realizados para se avaliar outras concentrações de GA₃ e se este pode realmente substituir a adição de água de coco no meio de cultura, o que traria um maior controle às condições de cultivo.

Apesar do grande número de ramos formados e desses se alongarem bem no meio de regeneração, houve grande dificuldade de enraizamento e manutenção desses ramos regenerados após a individualização dos mesmos. Tal fato contrasta com outros relatos para o gênero, os quais não acusam dificuldades no enraizamento e aclimação dos ramos regenerados, sendo suficiente a transferência dos ramos para meio MS com sais na metade da força para a indução de raízes (DORNELAS e VIEIRA, 1993, 1994; BIASI et al., 2000; MONTEIRO, 2000).

Experimentos envolvendo a utilização de ágar, ao invés de Phytigel, na fase de enraizamento devem ser realizados, uma vez que se demonstrou que substâncias presentes no ágar podem estimular o crescimento radicular em diversas espécies (ICHIMURA e ODA, 1998). Substrato alternativo como fibra de coco também tem se mostrado eficiente na indução e crescimento de raízes para várias espécies (GANGOPADHYAY et al., 2002). A utilização de outras auxinas para indução de raízes também deve ser testada. Em *P. edulis* var Norfolk Island, enraizamento foi obtido com 1 mg l⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), enquanto ácido indolbutírico (AIB) não foi efetivo na indução (KANTHARAJAH e DODD, 1990). Embora a concentração de 0,88 mg l⁻¹ de AIA já tenha sido utilizada com sucesso para diferentes espécies de *Passiflora* (DREW, 1991).

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas, haplóides ou diplóides, desenvolvem-se em plantas passando por estágios embriológicos característicos, mas sem a fusão de gametas (WILLIAMS e

MAHESWARAN, 1986). Diversas características distinguem a embriogênese somática da embriogênese zigótica, dentre elas destacam-se a não diferenciação de endosperma e suspensor (DODEMAN et al., 1997) e a falta de conexão vascular entre o explante e o embrião formado.

A embriogênese somática já havia sido relatada apenas para uma espécie do gênero, *P. giberti* (OTONI, 1995; ANTHONY et al., 1999). A embriogênese somática para essa espécie foi obtida a partir de suspensão celular de calos embriogênicos de explantes foliares induzidos com picloran. Após esses trabalhos com *P. giberti*, este é o primeiro relato de embriogênese para outra espécie do gênero.

A obtenção de embriogênese somática em *P. cincinnata* abre novas perspectivas de investigações para a espécie e para o gênero *Passiflora*. Entretanto, o estabelecimento de um protocolo em meio líquido ou com utilização de sistema RITA™, como relatado para café (ETIENNE-BARRY et al., 1999) seria bastante interessante, pois poderia maximizar o rendimento de embriões, além de diminuir os gastos com o preparo de meio de cultura e mão de obra.

Investigações sobre o papel das poliaminas e do etileno devem ser realizadas, uma vez que a atuação dessas substâncias pode ser determinante no processo de embriogênese somática, devido a grande sensibilidade ao etileno apresentada pelas espécies do gênero (FARIA e SEGURA, 1997; BARBOSA, 1999; BARBOSA et al., 2001; REIS, 2001; REIS et al., 2003). Não só os níveis totais de poliaminas, mas a razão entre Putrescina:Espermidina têm mostrado estreita relação com a capacidade embriogênica em arroz (SHOEB et al., 2001).

A influência do agente gelificante sobre a regeneração *in vitro* de *P. cincinnata* foi verificada. Não há um consenso na literatura sobre os fatores que caracterizam um agente gelificante de boa qualidade para o cultivo *in vitro* de uma espécie vegetal. Várias características podem gerar efeitos inibitórios ou mesmo estimulatórios para a cultura como a presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos, (DEBERGH, 1983; SCHOLTEN e PIERIK, 1998a, b; ICHIMURA e ODA, 1998a; BERRIOS et al., 1999; MARIA et al., 1999); a dureza do gel e disponibilidade de água (STOLTZ, 1971; KLIMAZEWSKA et al., 2000), a disponibilização de reguladores de crescimento (BORNMAN e

VOGELMANN, 1984) e a absorção de minerais (PODWYSZYNSKA e OLSEWSKI, 1995), e a difusão limitada de componentes do meio de cultura na matriz dos géis (ROMBERGER e TAMBOR, 1971; WILLIAMS, 1993). Além disso, a interação entre o agente gelificante e genótipos de uma mesma espécie já foi evidenciada (CHEVREAU et al., 1997; BERRIOS et al., 1999).

A especificidade do agente gelificante foi aqui demonstrada, uma vez que para *P. edulis* f. *flavicarpa*, melhores resultados foram obtidos em Phytigel (REIS, 2001), o que não foi verdadeiro para *P. cincinnata*. Esse dado reforça a necessidade de sempre se avaliar o melhor tipo de agente gelificante, mesmo para espécies de um mesmo gênero. Para *Rosa hybrida* não se recomenda a utilização de Phytigel, em virtude da baixa qualidade dos ramos obtidos nesse agente gelificante (PODWYSZYNSKA e OLSEWSKI, 1995). Já para *Rosa chinensis mínima*, foram obtidas taxas de multiplicação duas vezes maiores em Phytigel, sem alteração na qualidade dos ramos, quando comparada à utilização de ágar (NEŠŤÁKOVÁ et al., 2000). Apesar dos tipos de agentes gelificantes não terem causado grandes diferenças na FR, o número de ramos regenerados foi afetado. Resultado semelhante foi observado em *Fraxinus angustifolia* (TONON et al., 2001).

Tanto ágar quanto “gellan gum” necessitam de cátions divalentes para a polimerização e com isso quelatam grandes quantidades de Ca^{++} do meio de cultura (BRAND, 1993; LAINE et al., 2000). O fato do meio de cultura ter se liquefeito pode indicar que grande quantidade de Ca foi absorvida, uma vez que isso ocorreu nas repetições onde o número de gemas e o crescimento dos ramos foi maior. Talvez isso explique também o fato do número de ramos ter sido menor nos tratamentos com Phytigel e Gelrite, já que para esses a presença de cátions divalentes é imprescindível para gelificação, sendo talvez, menos disponibilizados para os tecidos do que em ágar. Em *Rosa hybrida*, o acréscimo de duas vezes a concentração de Ca e Mg ao meio de cultura aumentou significativamente a taxa de multiplicação (PODWYSZYNSKA e OLSZEWSKI, 1995). Além disso, a necessidade de se elevar a concentração de cálcio, dentre outros macroelementos, no meio de cultura para *P. edulis* f. *flavicarpa* já foi relatada (MONTEIRO et al., 2000). Esses autores realizaram seus experimentos utilizando Phytigel como agente gelificante, o que de certa forma vem ao encontro da hipótese aqui levantada.

O presente trabalho abre novas perspectivas de trabalho no gênero *Passiflora*, com a obtenção de embriogênese somática para outra espécie desse gênero. Trabalhos visando a transformação genética *P. cincinnata* baseados na regeneração via embriogênese somática poderão ser adotados como alternativa à organogênese, tendo em vista as dificuldades de enraizamento de ramos obtidos por essa via regenerativa. O presente trabalho também comprova a eficiência e viabilidade do método de escarificação pela retirada total do tegumento para outra espécie do gênero *Passiflora*, além de *P. edulis* f. *flavicarpa* (REIS, 2001).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa* DEG.) influenciada pela irradiância e sacarose.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002. 103 p. (Tese de Mestrado).
- ANTHONY, P, OTONI, W.C., POWER, J.B., LOWE, K.A.C., DAVEY, M.R. Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R.D. (ed.) **Methods in Molecular Biology, v.111: Plant Cell Culture Protocols.** Humana Press Inc., London, 1999. p.169-181.
- BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 70 p. (Tese de Mestrado).
- BARBOSA, W.M., OTONI, W.C., CARNELOSSI, M., SILVA, E., AZEVEDO, A.A., VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v. 7, p. 47-51, 2001.
- BECERRA, D.C., FORERO, A.P., GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p. 87-90, 2004.
- BORNMAN, C.H., VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, v.61, p.505-512, 1984.
- BIASI, L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p. 661-665, 2000.
- BRAND, M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.35, p.203-209, 1993.

- CHEVREAU, E., MOURGUES, F., NEVEU, M., CHEVALIER, M. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaves of pear. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.33, 173-179, 1997.
- COUCEIRO, M.A. **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 95 p. (Tese de Mestrado).
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.
- DODEMAN, V.L., DUCREUX, G., KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1493-1509, 1997.
- D'UTRA VAZ, F.B., SANTOS A.V.P, MANDERS, G., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical wood plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.
- ETIENNE-BARRY, D., BERTRAND, B., VASQUEZ, N., ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea Arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.11-117, 1999.
- FARIA, L C., SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 33, p.209-212, 1997.
- GIRI, A., RAVINDRA, S.T., DHINGRA, V., NARASU, M.L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. **Current Science**, v.81, p.378-382, 2001.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A, OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology. 2. ed. Edington, Exegetics Limited, 1993. 574 p.
- GUZZO, F., CEOLDO, S., ANDREETTA, F., LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, v.61, p.108-113, 2004.
- HALL, R.M., DREW, R.A, HIGGINS, C.M., DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an australian passion fruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v.48, p.673-680, 2000.

- KANTHARAJAH, A.S., DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, p.337-339, 1990.
- LAINE, E., LAMBLIN, F., LACOUX, J., DUPRE, P., ROGER, D., SIHACHAKR, D., DAVID, A. Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.77-80, 2000.
- LOMBARDI, S.P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* MAST.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 60p. (Tese de Mestrado).
- MANDERS, G., OTONI, W.C., D'UTRA VAZ, F.B., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Transformation of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 234-238, 1994.
- MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 134p. (Tese de Doutorado).
- MONTEIRO, A.C.B.A., NAKAZAWA, G.T., MENDES, B.M.J., RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v. 57, p.571-573, 2000.
- MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative *in vitro* des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Baley. **Fruits**, v. 33, p.693-699, 1978.
- MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeudes de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v. 29, p. 224-228, 1979.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NEŠTÁKOVÁ, M., HAVRLETOVÁ, M., FARAGÓ, J. Effect of gelling agents on *in vitro* multiplication of two ornamental plants. **Biologia, Bratislava**, v.55, p.409-411, 2000.
- NUNES, T.S., QUEIROZ, L.P., A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.1, p.33-46, 2001.
- OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, v.12, p.71-74, 2000.

- OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese de Doutorado).
- PASSOS, I.R.S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999. 128p. (Tese de Doutorado).
- PODWYSZYNSKA, M., OLSZEWSKI, T. Influence of gelling agents on shoot multiplication and uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose cordyline and homalomena. **Scientia Horticulturae** v.64, p.77-84, 1995.
- REIS, L. B. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes.** Viçosa:UFV, 2001. 89 p. (Tese de Mestrado).
- REIS, L.B., KOEHLER, A.D, COSTA, R.R, OTONI, W.C. **O período de enverdecimento *in vitro* dos explantes influencia a resposta morfogênica de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener).** In XXIII Encontro de Botânicos, SBB – Regional MG, BA e ES. Programa e Resumos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.111. 2001.
- REIS, L.B., PAIVA NETO, V.B., PICOLI, E.A.T., COSTA, M.G.C., RÊGO, M.M., CARVALHO, C.R., FINGER, F.L., OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v. 39, p. 618-622, 2003.
- ROMBERGER, J.A., TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. **American Journal of Botany**, v.58, p.131-140, 1971.
- SAADAT, Y.A., HENNERTY, M.J. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, v.95, p.251-260, 2002.
- SCHOLTEN, H.J., PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Reports**, v.17, p.230-235, 1998a.
- SCHOLTEN, H.J., PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.77, p.109-116, 1998b.
- SHA VALLI KHAN, P.S., HAUSMAN, J.F., RAO, K.R. Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alternifolium*. **Biologia Plantarum**, v.42, p.333-340, 1999.
- TREMBLAY, L., TREMBLAY, F.M. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. **Plant Science**, v.77, p.233-242, 1991.

- TONON, G., CAPUANA, M., DI MARCO, A. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.291-301, 2001.
- VERAMENDI, J., VILLAFRANCA, M.J., SOTA, V., MINGO-CASTEL, A.M. Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Baraka. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.33, p.195-199, 1997.
- WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.
- WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition *in vitro* — a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, v.41, p.237-251, 1992.

CAPÍTULO II

Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters) mediada por *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*

1. INTRODUÇÃO

O pré-requisito fundamental para a introdução de genes exógenos em plantas está na necessidade de um sistema eficiente de regeneração e de transformação genética. Vários fatores estão envolvidos na eficiência de transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium*, como: a estirpe e a concentração de *Agrobacterium*, o genótipo, o tipo e a idade do explante, o meio de cultura, os reguladores de crescimento, as condições de cultivo, o tipo e a concentração de antibióticos no meio seletivo e o sistema de co-cultivo dos explantes.

O sistema de transformação genética envolve a inoculação dos explantes com *Agrobacterium*, seguida pela transferência dos explantes infectados para um meio seletivo a fim de se regenerar a planta transgênica. A etapa de seleção é crítica, uma vez que envolve aspectos como a duração do período de exposição dos explantes à pressão de seleção, evitando a obtenção de escapes, assim como a escolha adequada do antibiótico seletivo e a sua concentração, para que haja equilíbrio entre a seleção efetiva e o não-comprometimento da morfogênese dos explantes.

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* tem sido a mais utilizada no gênero *Passiflora*, a qual foi obtida pela primeira vez por MANDERS et al. (1994). Após esse trabalho, diversos outros também foram realizados com *A. tumefaciens* (SILVA, 1998; BRAZ, 1999; HALL et al., 2000) e *A. rhizogenes* (OTONI, 1995; NISIZAKI, 1999). Experimentos com transformação direta por meio de aceleração de partículas também já foram realizados (OTONI, 1995; OTONI et al., 1996; TAKAHASHI, 2002). Todos

esses trabalhos envolveram *P. edulis* f. *flavicarpa*, com exceção de OTONI (1995) e OTONI et al. (1996), que foram realizados com *P. giberti*.

Apesar da regeneração *in vitro* para o gênero não ser de todo um obstáculo, obtendo-se indução *de novo* de gemas e conversão dessas em ramos alongados a partir de diversos tipos de explantes (MANDERS et al., 1994; DORNELAS e VIEIRA, 1994; MOHAMED et al., 1996; FARIA e SEGURA, 1997; SILVA, 1998; PASSOS, 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; REIS, 2001; ALEXANDRE, 2002; COUCEIRO, 2002; BECERA, 2004), a transformação genética ainda enfrenta problemas, sobretudo com a baixa frequência de transformação e com o grande número de escapes (SILVA, 1998; TAKAHASHI, 2002; MONTEIRO, 2005).

Tendo em vista os problemas de resistência natural do maracujazeiro à Canamicina e de sua interação com agentes gelificantes (SILVA, 1999; REIS, 2001), a busca por agentes seletivos alternativos à Canamicina vem sendo realizada para maracujazeiro. A utilização de Higromicina aparece como uma alternativa viável (BARBOSA, 1999; TAKAHASHI, 2002). Contudo, esse antibiótico ainda não foi avaliado para outras espécies do gênero, exceto para o maracujazeiro-amarelo, assim como para explantes de hipocótilo. Mais recentemente, o uso do gene *bar*, que confere tolerância à fosfotricina, foi proposto para a transformação da espécie (MONTEIRO, 2005).

O uso de antibióticos e herbicidas como agentes seletivos é visto com desconfiança pela opinião pública, principalmente pelo limitado conhecimento acerca dos impactos dessas substâncias no meio ambiente e na saúde humana (WANG et al., 2000), de tal forma que a retirada dos genes de resistência a antibióticos seria desejável (HANSEN e WRIGHT, 1999). Nesse sentido, diversos outros marcadores e estratégias para retirada dos genes marcadores das plantas transformadas têm sido propostos (ARAGÃO e BRASILEIRO, 2002). A utilização do gene de mutantes “shooter” de *A. tumefaciens* pode ser extremamente vantajosa, pois eliminaria a necessidade de genes de resistência a antibióticos ou a herbicidas. Esses mutantes são capazes de gerar ramos em tecidos cultivados sem a presença de reguladores de crescimento, ao invés de tumores, como ocorre com as linhagens selvagens de *Agrobacterium* (MIHÁLKA et al., 2003).

O presente trabalho objetivou avaliar a influência dos antibióticos Canamicina e Higromicina e a interação desses com agentes gelificantes sobre a morfogênese de explantes hipocotiledonares de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters). Tais avaliações serviram de base para o estabelecimento e implementação de protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*, aqui apresentados, para essas duas espécies de maracujazeiros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Nos ensaios experimentais foram utilizados explantes oriundos de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* variedade FB-100 Maguary (Viveiros Flora Brasil, Araguari, MG) e *P. cincinnata* obtidas de sementes germinadas *in vitro*. A variedade FB-100 provém de 16 anos de melhoramento genético e sua principal destinação é a indústria de suco. As sementes de *P. cincinnata*, por sua vez, foram obtidas de frutos oriundos de polinização aberta no pomar do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa.

As sementes foram germinadas em condições assépticas conforme REIS (2001) e mantidas no escuro por 15 dias para estiolamento. Após esse período as plântulas foram levadas para sala de crescimento, onde foram mantidas por mais 15 dias a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e fotoperíodo de 16 horas, para enverdecimento.

2.2. Influência de antibióticos na regeneração *in vitro* de maracujá

Os segmentos de hipocótilo foram inoculados em meio de regeneração, constituído de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l^{-1} de mio-inositol e 3% (p/v) de sacarose, acrescido de 1 mg l^{-1} de BAP (6-benzilaminopurina) para *P. edulis* f. *flavicarpa*. Para *P. cincinnata*, o meio de regeneração foi acrescido de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP e 10% de água de coco

(AC). A concentração de BAP foi reduzida à metade no primeiro recultivo, realizado após 15 dias de cultivo. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e $2,5 \text{ g l}^{-1}$ de Phytigel™ (Sigma Chemical Company, USA) foram utilizados para gelificação. O meio de cultura, após 15 min de autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,1 \text{ atm}$ de pressão), foi vertido em placas de Petri (60 x 15 mm) estéreis de poliestireno cristal.

As soluções de Canamicina B e Higromicina (Sigma Chemical Company, USA) e Timentin® (Smithkline Beecham Brasil LTDA, Brasil) utilizadas foram esterilizadas por meio de filtro Millex-GS, com poros de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro (Millipore, USA), sendo adicionadas ao meio de cultura durante seu resfriamento após autoclavagem, nas concentrações indicadas na Figura 1 (*P. cincinnata*) e Figura 5 (*P. edulis*).

Seis explantes de *P. cincinnata* e 5 explantes de *P. edulis* foram inoculados por placa e cada combinação de antibiótico foi considerada um tratamento, com 5 repetições. Ao final de 30 dias as culturas foram avaliadas quanto à frequência de regeneração (FR) e ao número de ramos por explante, sendo considerado aqueles com tamanho igual ou maior que 3 mm para *P. cincinnata* e 2 mm para *P. edulis*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

Experimento complementar foi realizado para *P. cincinnata*, no qual foram avaliadas as concentrações de 0, 16, 20 e 24 mg l^{-1} de Higromicina combinadas com 300 mg l^{-1} de Timentin. As condições de cultivo e avaliação foram semelhantes ao primeiro experimento, exceto pela preparação de meio de cultura gelificado com $2,5 \text{ g l}^{-1}$ de Phytigel ou 8 g l^{-1} de ágar (Vetec Química Fina Ltda., Brasil), sendo inoculados 5 explantes por placa, com 5 repetições. Cada combinação de antibióticos foi considerada um tratamento e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

2.3. Transformação via *Agrobacterium rhizogenes* R1601

Para transformação foi utilizada a estirpe R1601 de *A. rhizogenes*, que possui os plasmídeos pRiA4b, contendo o gene quimérico *nptII*, e o plasmídeo pTVK291, em *trans*, o qual confere à bactéria o fenótipo de supervirulência (TEPFER e CASSE-DELBART, 1987).

As bactérias foram mantidas em meio Rhizo (TEPFER e CASSE-DELBART, 1987) gelificado com 0,8% (p/v) de ágar (Merck, Germany), suplementado com 100 mg l⁻¹ de Canamicina e Ampicilina, sendo realizados recultivos mensais. As bactérias foram conservadas em refrigerador, a 4°C, após crescimento por 24 h a temperatura de 28 °C.

No dia anterior à inoculação dos explantes, uma colônia isolada foi colocada para crescer em Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio Rhizo acrescido de 100 mg l⁻¹ de Canamicina e Ampicilina (Sigma Chemical Company, USA), sob agitação de 200 rpm, no escuro, à temperatura de 28 °C por 16 horas aproximadamente. Ao fim desse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 min, a 5000 rpm (rotor JA-20), sob temperatura de 5°C. O precipitado foi ressuscitado em meio MS líquido, com 2% (p/v) de sacarose, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968) e 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, pH 5,8 ± 0,1, sendo a densidade ótica ajustada para 0,5 e 0,25 ($\lambda = 600$ nm).

Os explantes utilizados constituíram-se do terço basal das plântulas, que foram decapitadas e tiveram suas raízes aparadas no dia anterior à inoculação da solução bacteriana. Após decapitação e toailete das raízes, de 3 a 4 explantes foram transferidos para cada tubo de ensaio, o qual continha meio de cultura constituído de sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) na metade da concentração original, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l⁻¹ de mio-inositol e 2% (p/v) de sacarose. O meio foi gelificado com 2,5 g l⁻¹ de Phytigel e teve o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A inoculação da solução de bactérias foi realizada com auxílio de pinça “dente de rato”, com a qual se fez de dois a quatro ferimentos no explante, sobretudo na região apical. O número de explantes com diferenciação de raízes na extremidade inoculada foi contado para fins de cálculo da taxa de infecção.

Após 20 dias da inoculação, as raízes regeneradas foram isoladas e inoculadas em meio seletivo, composto de sais básicos MS, 3% (p/v) de sacarose, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968) e 100 mg l⁻¹ mio-inositol, acrescido de 150 mg l⁻¹ de Canamicina e 350 mg l⁻¹ de Timentin. O meio foi gelificado com 2,5 g l⁻¹ de Phytigel e teve o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. As raízes que apresentaram crescimento

nesse meio seletivo foram recultivadas a cada 15 dias, sendo a concentração de Canamicina aumentada para 200 mg l⁻¹ nos recultivos subsequentes.

Todos os antibióticos utilizados foram esterilizados em filtro Millex-GS, com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, USA) e adicionados ao meio de cultura durante o resfriamento após autoclavagem.

2.4. Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* SHOOTER

A bactéria *A. tumefaciens* SHOOTER foi gentilmente cedida pelo Dr. Istvan Nági (ABC Biotechnology Center, Gödöllo, Hungria). As colônias de bactéria foram mantidas em meio composto de 5 g l⁻¹ de peptona, 1 g l⁻¹ de extrato de levedura, 5 g l⁻¹ de extrato de carne, 5 g l⁻¹ de sacarose e 0,24 g l⁻¹ de MgSO₄, gelificado com 0,8% (p/v) de ágar (Merck, Germany), contendo 100 mg l⁻¹ de Rifamicina, 50 mg l⁻¹ de Carbenicilina e 100 mg l⁻¹ de Canamicina (Sigma Chemical Company, USA).

No dia anterior à inoculação, os segmentos de hipocótilo foram cortados e inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura composto de sais básicos MS, 3% (p/v) de sacarose, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968) e 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, recoberto por papel-filtro (meio para co-cultivo). Nesse mesmo dia, uma colônia isolada da bactéria foi colocada para crescer em 50 ml de meio utilizado para manutenção, na forma líquida, em Erlenmeyer de 125 ml, por aproximadamente 30 h, a temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 200 rpm.

A centrifugação e a ressuspensão das bactérias foram realizadas conforme descrito no item 2.3. A inoculação das bactérias foi realizada por imersão dos explantes em 20 ml da solução bacteriana, com densidade ótica ajustada para 0,5 ou 0,25 ($\lambda = 600$ nm), por um período de 4 h, no escuro, a temperatura de 28°C. Após a inoculação, os explantes foram secos em papel-filtro para retirada do excesso de solução bacteriana e retornaram para o meio de co-cultivo, no qual permaneceram por um período de 2 dias, no escuro.

Após esse período, os explantes foram recultivados em meio seletivo, o qual consistiu do meio de co-cultivo acrescido de 300 mg l⁻¹ de Timentin, sem a utilização de papel-filtro. As culturas foram transferidas para luz, sob irradiância

de cerca de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) e fotoperíodo de 16h. Foram realizados recultivos quinzenais e os ramos regenerados foram isolados e mantidos em frascos de 250 ml contendo 30 ml desse mesmo meio, para crescimento e enraizamento.

Os ramos que apresentavam raízes foram transferidos, em condições assépticas, para potes Phytakon de 500 ml (Sigma Chemical Company, USA) contendo fibra de coco umedecida com água deionizada, autoclavado. Os potes permaneceram em sala de crescimento até observação do crescimento das raízes, quando foram retirados da sala de crescimento e tiveram as tampas parcialmente abertas. A tampa foi totalmente retirada após 20 dias, sendo as plantas transferidas para casa-de-vegetação 60 dias após saída da sala de crescimento.

Para a condução dos experimentos de transformação genética foram obedecidas as normas de biossegurança da CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), com descarte seletivo por autoclavagem ou incineração de todo o material transgênico envolvido nos experimentos.

2.5. Análise molecular das raízes e ramos regenerados

As raízes provenientes da transformação com *A. rhizogenes* R1601 (item 2.2) que apresentaram crescimento no meio seletivo e os ramos regenerados em meio sem reguladores, provenientes da transformação com SHOOTER (item 2.3), tiveram seu DNA genômico total extraído segundo metodologia descrita por DOYLE e DOYLE (1990). A comprovação da transformação foi realizada por meio da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR), empregando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *nptII* ou *gus*, para detecção de possíveis transformantes provenientes da transformação com *A. rhizogenes* e SHOOTER, respectivamente.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 μl , contendo 30 ng de DNA, 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM de MgCl_2 , 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTPs e 1 μM de cada *primer* específico. O termociclador (Perkin-Elmer, modelo 9600, USA) foi programado para um ciclo inicial a 94°C por 3 min e 34 ciclos de amplificação constituídos de uma etapa de desnaturação a 94°C , por 90 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao

DNA molde a 60° C, por 60 segundos, e uma etapa de extensão a 72° C, por 90 segundos. Ao final dos ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a 72° C, por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% (p/v), contendo 0,2 mg ml⁻¹ de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação “Eagle Eye II” (Stratagene, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Influência de antibióticos na regeneração *in vitro* de maracujá

O efeito dos antibióticos Timentin (isoladamente) e Canamicina e Higromicina (combinados com Timentin), na morfogênese *in vitro* de *P. cincinnata* pode visualizado na seqüência de figuras de 1 a 4.

Essa espécie se mostrou sensível à Canamicina, havendo grande redução da freqüência de regeneração (FR) na dose de 150 mg l⁻¹ e a inibição total da formação de gemas com 200 mg l⁻¹ desse antibiótico (Figuras 1A e 2). O alongamento dessas gemas foi bastante afetado pela adição dos antibióticos ao meio de regeneração, mesmo quando apenas Timentin estava presente (Figura 1A; 2A e 2B). A menor dose de Canamicina testada (50 mg l⁻¹) inibiu drasticamente a formação de ramos, que foi completamente inibida com a dose de 150 mg l⁻¹ de Canamicina (Figura 1A).

Para Higromicina, não foi obtida inibição severa da FR na dose máxima testada (Figuras 1B e 2). Semelhante a Canamicina, a formação de ramos foi fortemente inibida pela menor dose testada do antibiótico, mas inibição total do desenvolvimento de ramos só foi alcançada com a dose de 8 mg l⁻¹ de Higromicina (Figura 1B). Nas Figura 2H a L, pode-se notar a formação de calos e gemas em todos os tratamentos, embora os explantes se mostrassem senescentes, com coloração marrom, principalmente nas concentrações mais elevadas de Higromicina.

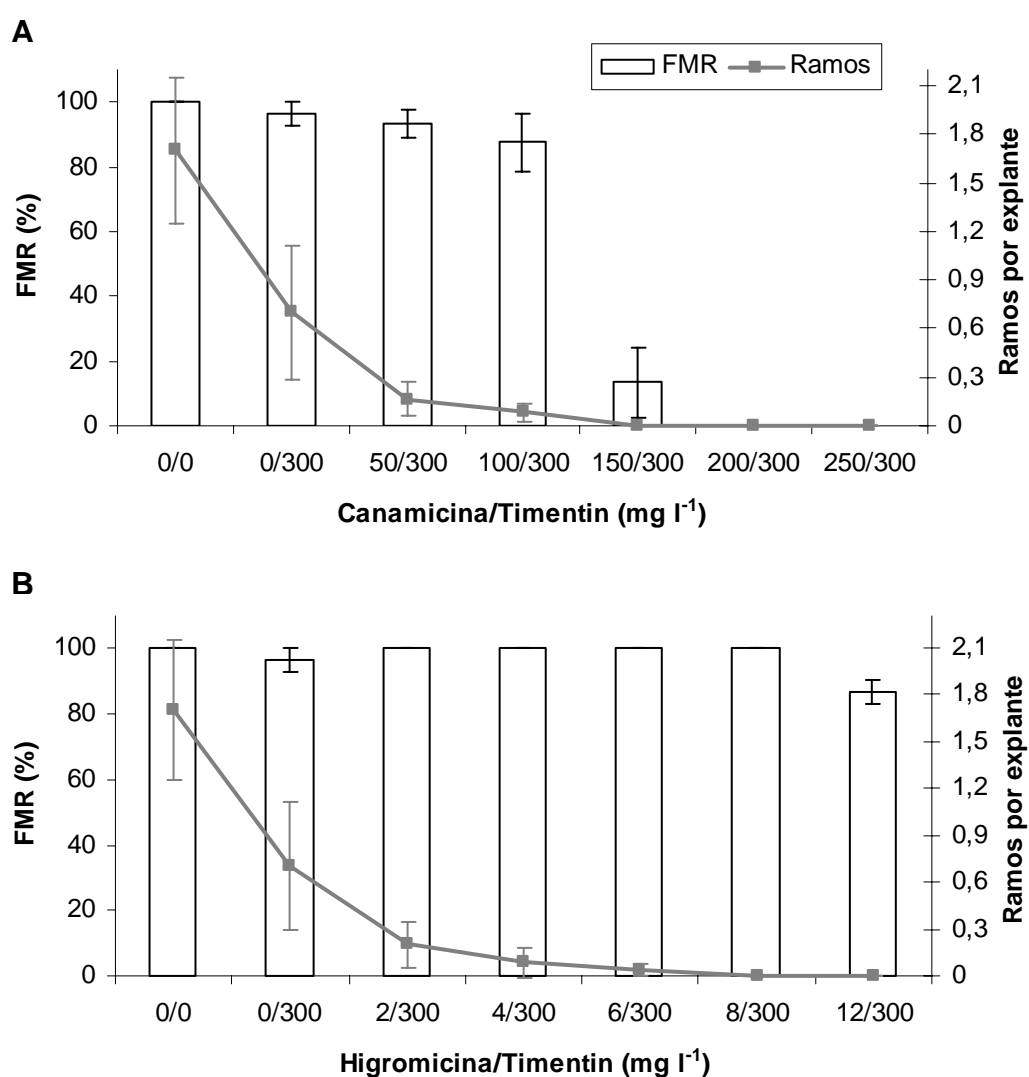


Figura 1 – Frequência de regeneração (FR) e número médio de ramos por explante de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* aos 30 dias de cultivo em diversas concentrações de antibióticos. **A-** Efeito dos antibióticos Canamicina e Timentin. **B-** Efeito dos antibióticos Higromicina e Timentin. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

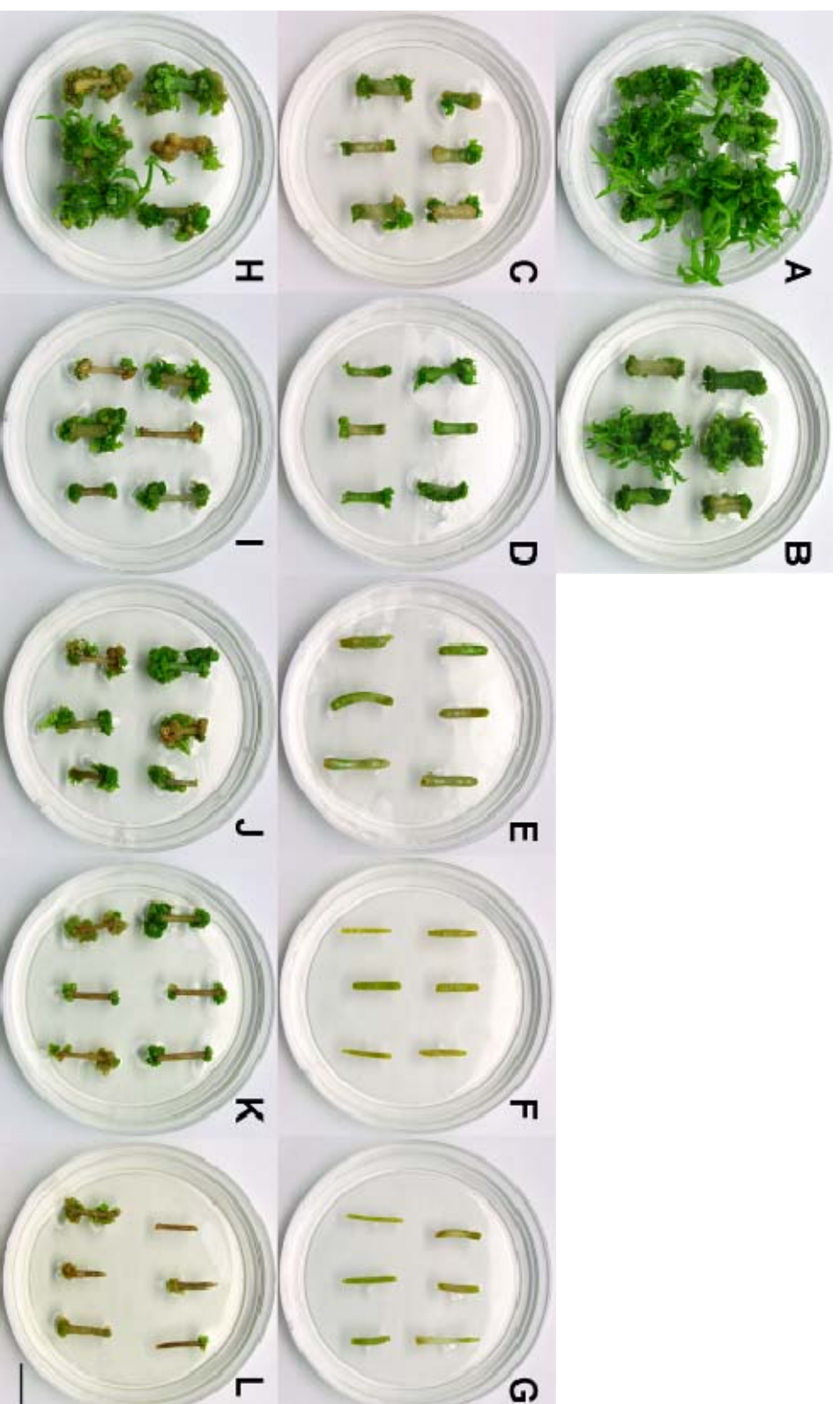


Figura 2 – Aspecto geral das culturas de explantes de hypocótilo de *Passiflora cincinnata* cultivados em diversas concentrações de antibióticos. **A**- Controle sem antibióticos. **B**- Tratamento com 300 mg l⁻¹ de Timentin (300T) somente. **C** a **G**- 50, 100, 150, 200 e 250 mg l⁻¹ de Canamicina mais 300T. **H** a **L**- 2, 4, 6, 8 e 12 mg l⁻¹ de Higromicina mais 300T. A barra corresponde a 10 mm.

Tendo em vista que a inibição da FR não foi obtida na dose de 12 mg l⁻¹ de Higromicina, um segundo experimento foi realizado para avaliar as doses de 16, 20 e 24 mg l⁻¹ e também para se verificar a interação entre antibiótico e agente gelificante.

A FR teve comportamento distinto nos dois agentes gelificantes testados (Figura 3). Em Phytigel, a FR caiu para o valor médio de 4% (Figura 3A), na maior dose testada. Em ágar Vetec esse valor foi 11 vezes maior (Figura 3B). Na Figura 4 pode ser visto o aspecto geral das culturas. A formação de ramos foi esporádica. Embora houvesse desenvolvimento de algumas folhas, não havia alongamento do caule, que na maioria das vezes não atingiu 3 mm, tamanho mínimo estabelecido.

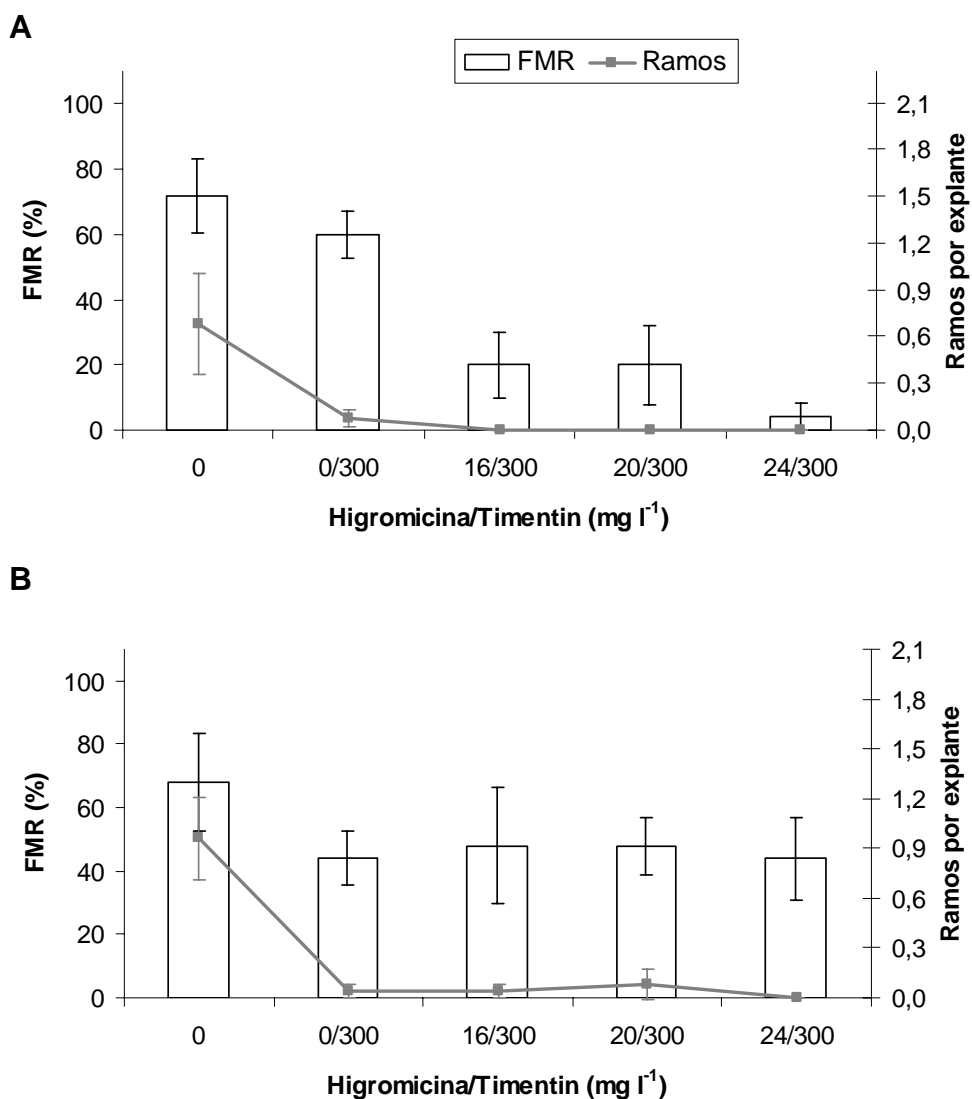


Figura 3 – Frequência de regeneração (FR) e número médio de ramos por explante de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* aos 30 dias de cultivo em meio de regeneração gelificado com Phytigel (**A**) e ágar Vetec (**B**), suplementado com diversas concentrações dos antibióticos Higromicina e Timentin. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

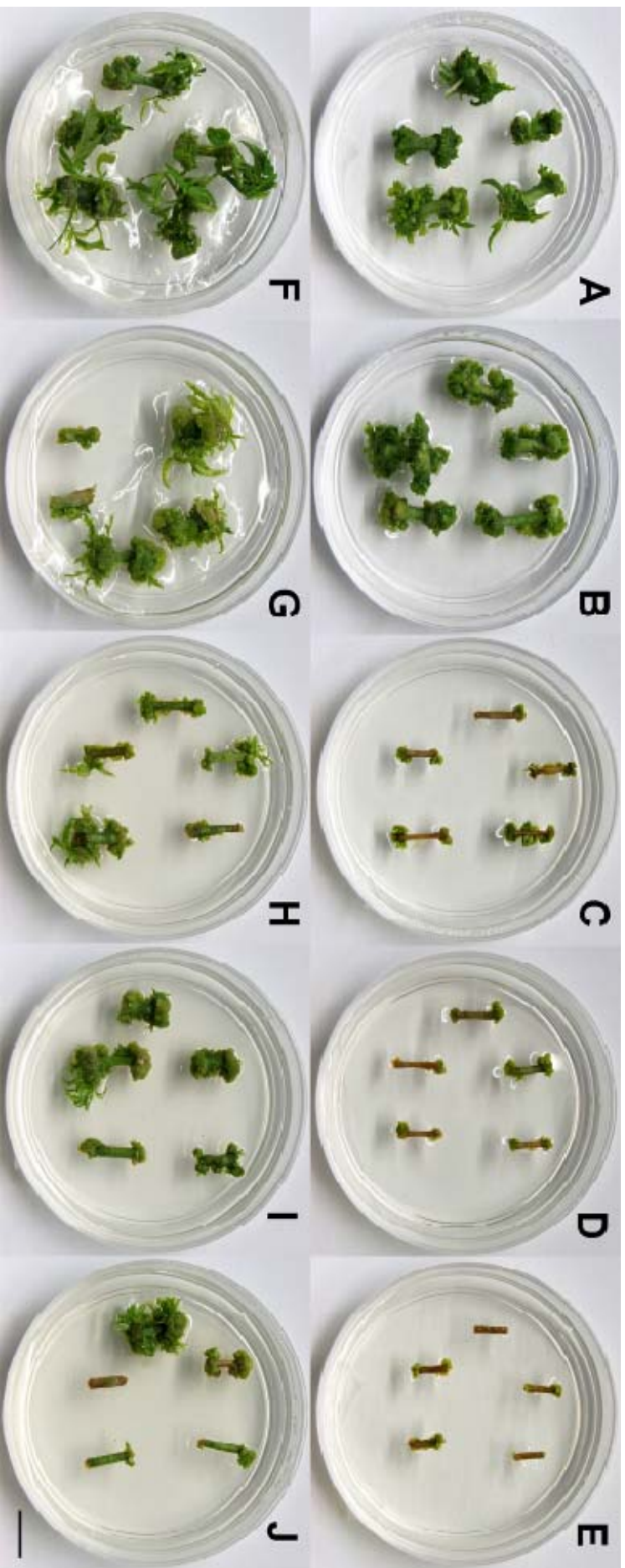


Figura 4 – Aspecto geral de explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* aos 30 dias de cultivo em meio de regeneração suplementado com concentrações de 0, 0 e 300, 16 e 300, 20 e 300, 24 e 300 mg l⁻¹ dos antibióticos Higromicina e Timentin e gelificado com Phytagel (A-E) e ágar Vetec (F-J). A barra corresponde a 10 mm.

Para *P. edulis* f. *flavicarpa* a dose de 20 mg l⁻¹ de Higromicina não chegou a inibir totalmente a formação de gemas, mas a reduziu esse parâmetro para valor próximo a 20% (Figura 5). É interessante notar a menor quantidade de ramos formados por essa espécie em relação à *P. cincinnata* (Figuras 1 e 5). Devido à dificuldade de alongamento dos ramos nessa espécie, considerou-se aqueles com comprimento igual ou maior a 2 mm.

Tal como observado anteriormente em *P. cincinnata*, o número de ramos por explante foi bastante reduzido pelo Timentin e também pela menor dose de Higromicina testada (Figura 5). A Figura 6 apresenta um aspecto geral dos explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa* tratados com diversas doses de Higromicina.

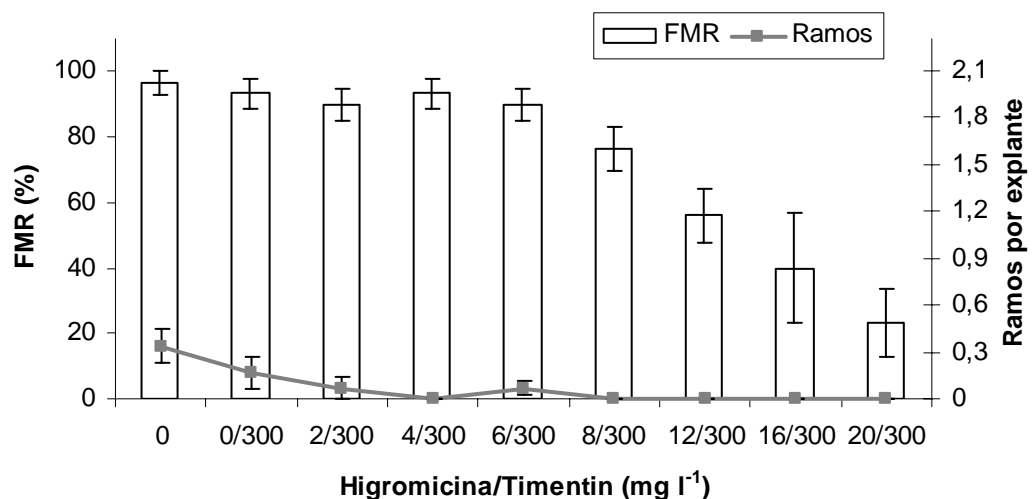


Figura 5 – Frequência de regeneração (FR) e número médio de ramos por explante em hipocótilos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* aos 30 dias de cultivo, em meio de regeneração suplementado com diversas concentrações dos antibióticos Higromicina e Timentin. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

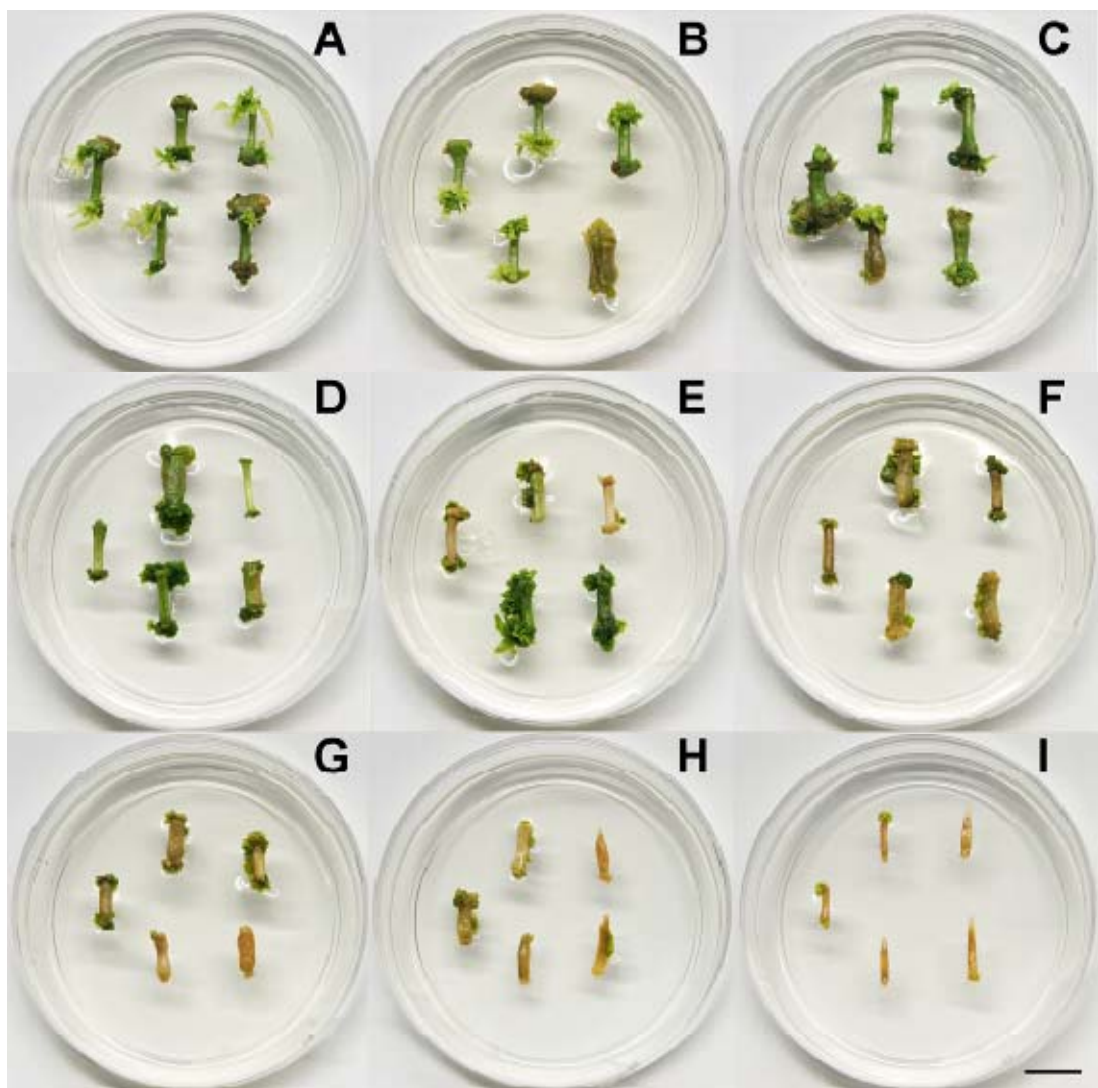


Figura 6 – Aspecto de culturas de explantes de hipocótilo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* aos 30 dias de cultivo em meio de regeneração suplementado com concentrações de 0 (sem Higromicina e Timentin) (A), 0 (sem Higromicina e com Timentin) (B), 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 20 mg l⁻¹ de Higromicina mais 300 mg l⁻¹ de Timentin (C a I). A barra corresponde a 10 mm.

3.2. Transformação de maracujazeiros (*Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*) via *Agrobacterium rhizogenes* R1601

A utilização de solução bacteriana com densidade ótica (OD) ajustada para 0,25 gerou maior número de explantes de *P. cincinnata* com formação de raízes que na densidade de 0,50 (Figura 7). Foram inoculados ao todo 122 explantes com solução bacteriana com OD ajustada para 0,25 e 96 explantes para a OD de 0,50. A aparência dos explantes antes do isolamento das raízes formadas pode ser observada na Figura 8A. Foram poucas as perdas de explantes devido à senescência induzida pelo supercrescimento bacteriano (Figura 8B).

Os explantes inoculados geraram uma média de 0,91 e 0,36 raízes por explante para as ODs de 0,25 e 0,50, respectivamente. Nenhuma raiz foi obtida das plantas controle, inoculadas com meio MS líquido. Do total de raízes formadas nos explantes inoculados com solução com menor OD, 35,14% delas se desenvolveram após transferência para meio seletivo. A porcentagem para o tratamento com maior OD foi de 23,53%.

Nas Figuras 8C e D podem ser observadas, respectivamente, raízes não transformadas e transformadas cultivadas em meio seletivo. Essas se apresentaram bastante oxidadas e sem crescimento, esse último limitado pela presença do agente seletivo Canamicina.

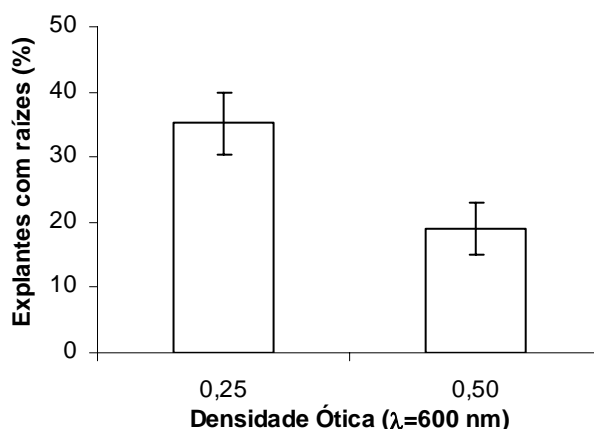


Figura 7 – Porcentagem de explantes de *Passiflora cincinnata* que desenvolveram raízes após infecção com solução de *Agrobacterium rhizogenes* R1601 nas densidades óticas de 0,25 e 0,50 ($\lambda=600$ nm). As barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

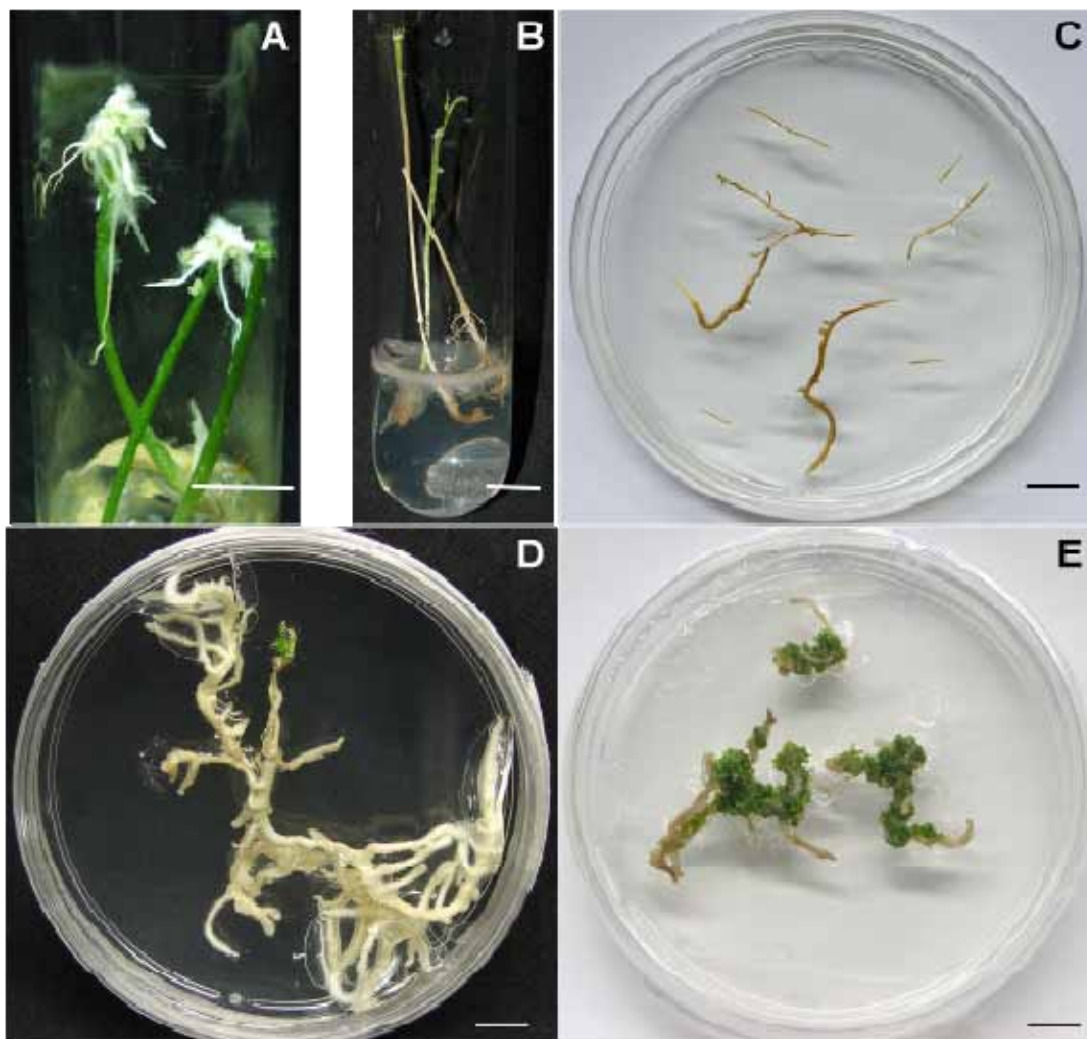


Figura 8 – Aspecto de explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* inoculados com *Agrobacterium rhizogenes* (A e B) e raízes cultivadas em meio seletivo contendo 200 e 350 mg l⁻¹ de Canamicina e Timentin (C a F), respectivamente. A- Detalhe de raízes regeneradas em explante de hipocótilo. B- Explantes senescentes devido ao supercrescimento de *A. rhizogenes*. C- Raízes não transformadas cultivadas em meio seletivo. D- Raiz isolada regenerada de explante infectado por *A. rhizogenes*. E - Segmentos de raiz apresentando formação de gemas em meio seletivo, sem presença de reguladores de crescimento. As barras correspondem a 10 mm.

Em várias raízes houve a diferenciação de gemas durante o cultivo em meio seletivo (Figuras 8D, E e 9A, C, E e F). Essas gemas em geral não se alongaram como aquelas obtidas por meio de regeneração adventícia em explantes de hipocótilo (Figura 2A, para comparação). Porém, em algumas culturas, ainda que em baixa frequência, foi observada a tendência de alongamento dessas gemas (Figura 9F). De forma geral, as gemas se formavam na região distal das raízes ou na base de raízes secundárias (Figura 9C). Gemas mal formadas e com sintomas de hiperidricidade também foram observadas (Figura 9E).

Embriões somáticos foram observados em 3 explantes, após transferência para o meio seletivo. Calos embriogênicos foram formados, provavelmente, a partir de tecido radicular e/ou de região calejada do hipocótilo onde foi feita a infecção por *Agrobacterium* (Figura 9B). Os calos embriogênicos mostraram-se altamente proliferativos, característica que foi mantida durante os subcultivos e recultivos subseqüentes. Os embriões formados apresentaram-se, via de regra, bem formados e individualizados (Figuras 9D e G).

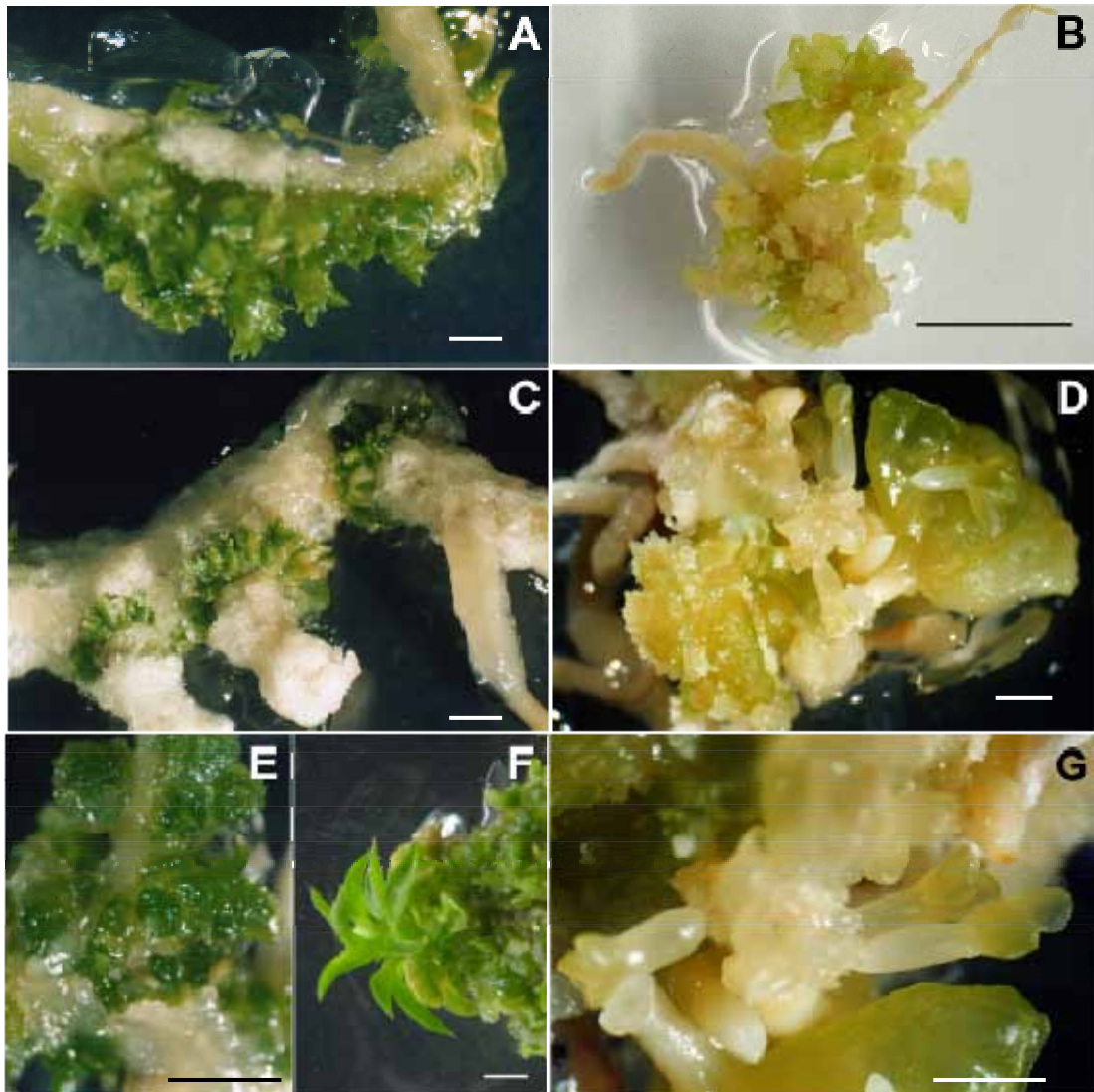


Figura 9 – Aspecto da organogênese e da embriogênese somática ocorridas em segmentos de raízes *Passiflora cincinnata* obtidas pela infecção de *Agrobacterium rhizogenes* R1601 cultivadas em meio seletivo sem adição de reguladores de crescimento. **A-** Aspecto de gemas formadas. **B-** Aspecto geral do calo embriogênico. **C-** Formação de gemas na base das raízes secundárias. **D e G-** Detalhes dos embriões formados. **E-** Gemas com sintomas de hiperhidricidade. **F-** Ramo normal alongado. As barras correspondem a 1 mm, exceto em **B**, que corresponde a 10 mm.

3.3. Análise molecular das raízes regeneradas

Das raízes que apresentaram crescimento em meio seletivo foram selecionadas aquelas que apresentavam crescimento mais vigoroso para realização de PCR. Um total de 27 raízes foi analisado para *P. cincinnata* e 17 raízes para *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os produtos da amplificação por PCR para o gene *nptII* podem ser visualizados na Figura 11.

Foi obtida resposta positiva para todas as raízes testadas, confirmando a natureza transgênica das raízes.

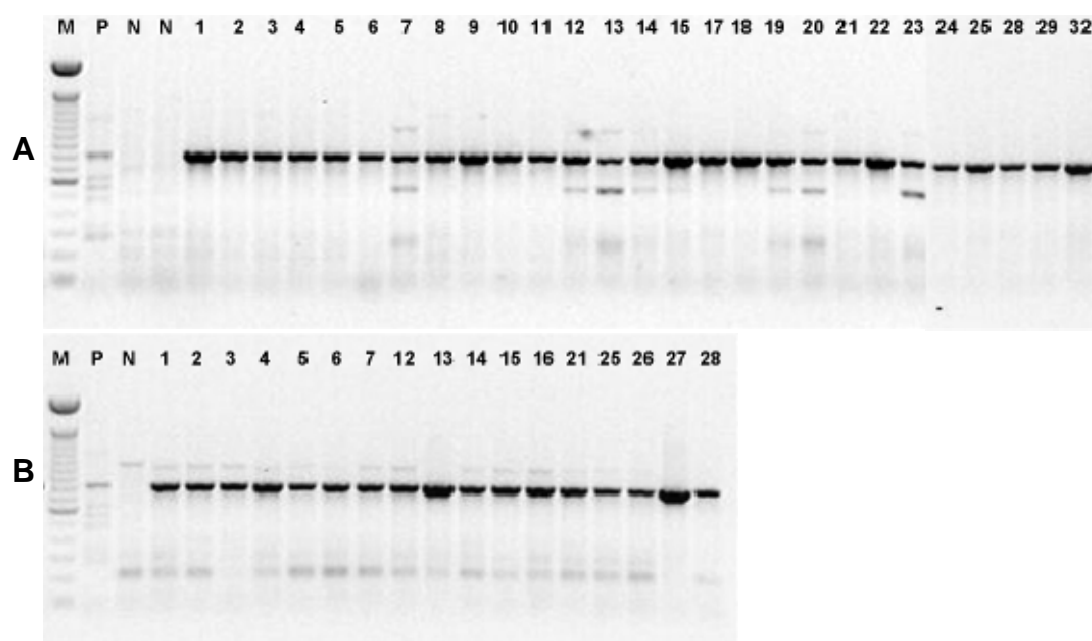


Figura 11 – Produtos da amplificação por PCR do gene *nptII* a partir de DNA genômico extraído de raízes de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, utilizando-se oligonucleótidos específicos para esse gene. **M**- marcador “1kb DNA ladder”; **P**- controle positivo (plasmídeo pCambia 2301); **N**- controle negativo (plantas não transformadas). Números de **1 a 32 (A)** e de **1 a 28 (B)** raízes de *P. edulis* e *P. cincinnata* transformadas, respectivamente.

3.4. Transformação com *Agrobacterium tumefaciens* SHOOTER

O melhor resultado foi obtido pela utilização de solução bacteriana com OD ajustada para 0,25. Para a solução com OD de 0,50, boa parte dos explantes foi perdida durante o cultivo devido ao supercrescimento bacteriano. Cento e cinquenta explantes foram inoculados para cada OD. Desse total, foram obtidas 6 plantas regeneradas em meio desprovido de reguladores de crescimento, 5 delas provenientes da inoculação com solução com OD de 0,25.

O ensaio histoquímico realizado para o gene *gus* não evidenciou a coloração azul característica nos tecidos. Entretanto, a amplificação por PCR, com *primers* específicos, indicou a presença desse gene no DNA genômico extraído das folhas dos ramos regenerados (Figura 12).

Das seis plantas regeneradas, apenas 3 foram aclimatizadas em casa de vegetação. As demais foram perdidas durante a aclimação.

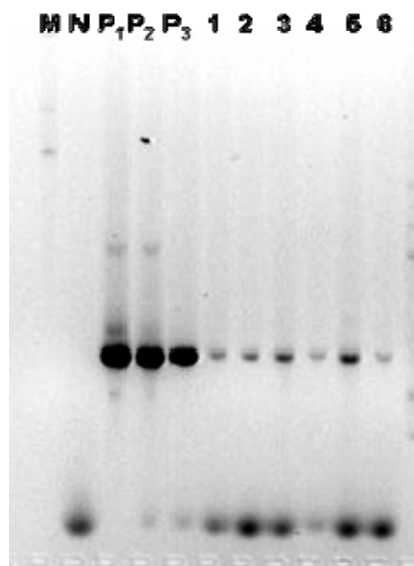


Figura 12 – Produtos da amplificação por PCR do gene *gus* a partir de DNA genômico extraído de tecido foliar de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, utilizando-se oligonucleótidos específicos para esse gene. **M**- marcador “1kb DNA ladder”; **N**- controle negativo (planta não transformada); **P1-3**: controles positivos (plasmídeo pCambia 2301) Plantas **1 a 6**: *P. edulis* f. *flavicarpa* transformadas.

4. DISCUSSÃO

É essencial para um sistema eficiente de transformação genética que o tecido alvo contenha células competentes para regeneração, que haja um método para introduzir o DNA exógeno nessas células e que se obtenha uma frequência satisfatória de regeneração e seleção das plantas transformadas (BIRCH, 1997). A transformação genética do maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*), via *Agrobacterium tumefaciens* foi relatada primeiramente por MANDERS et al. (1994). Esses autores obtiveram três plantas transformadas, mediante a utilização de uma estirpe desarmada de *A. tumefaciens* (GV3111SE), contendo o vetor co-integrado pMON200, o qual carregava o gene *nptII*. Esse trabalho abriu novas perspectivas para o melhoramento genético do maracujá, espécie vegetal de ascendente importância comercial. No caso específico dos maracujazeiros, a transformação de plantas se constitui em uma alternativa de transferência de genes de resistência a doenças (BRAZ, 1999; TAKAHASHI, 2002; ALFENAS et al. 2005; MONTEIRO, 2005).

Devido as respostas morfogênicas de tecidos cultivados *in vitro* são influenciadas por compostos adicionados ao meio de cultura, inúmeros trabalhos começaram a ser desenvolvidos com o objetivo de se estudarem os efeitos desses antibióticos na morfogênese vegetal (COSTA et al., 2002).

As espécies de *Passiflora* avaliadas no presente trabalho se mostraram bastante resistentes à seleção por meio de antibióticos, principalmente explantes de hipocótilo, onde quantidades superiores a 200 mg l⁻¹ de Canamicina ou 24 mg l⁻¹ de Higromicina foram necessárias para inibir a indução de gemas. Trabalhos anteriores já indicavam essa alta resistência de explantes de hipocótilo de maracujazeiro-amarelo à Canamicina, a qual é

aumentada com o uso de Phytigel (REIS, 2001), bem como a elevada frequência de escapes na transformação utilizando-se explantes foliares e seleção com 100 mg l⁻¹ de Canamicina (MANDERS et al., 1994; SILVA, 1998).

Contudo, a utilização de Higromicina pode ser viável, haja vista que a inibição da formação de ramos se deu em concentrações bastante menores. Para explantes foliares, a Higromicina inibiu completamente a indução de gemas em maracujazeiro-amarelo, em dose de 4 mg l⁻¹ (BARBOSA, 1999) e 5 mg l⁻¹ (TAKAHASHI, 2002), o que corrobora a observação de que segmentos de hipocótilo são mais resistentes aos antibióticos. Todavia, o antibiótico Higromicina mostrou-se eficiente como agente de seleção, causando redução drástica na divisão celular de protoplastos de maracujazeiro em concentrações acima de 4 mg l⁻¹ (MONTEIRO, 2005).

Além do tipo de explante, o tipo de agente gelificante também deve ser levado em consideração, já que diferentes agentes gelificantes podem influenciar na disponibilização dos antibióticos, interferindo na eficiência de seleção de um protocolo de transformação (CHEVREAU et al., 1997; CHAUVIN et al., 1999; LAINE et al., 2000; REIS, 2001). Contudo, ao contrário do observado por esses autores para Canamicina, que foi menos ativa em meio gelificado com “gellan gum”, os resultados do presente trabalho mostraram maior eficiência de seleção da Higromicina em meio gelificado com Phytigel para *P. cinnnata*. Entretanto, não se pode afirmar que tal efeito seja decorrente da indisponibilização do antibiótico, visto que o ágar, por si só, quando comparado com Phytigel, promoveu a regeneração nessa espécie (Capítulo I).

O uso de Timentin afetou negativamente a formação de ramos nas duas espécies avaliadas. Entretanto esse antibiótico já se mostrou menos prejudicial para *P. edulis* f. *flavicarpa* do que Cefotaxima (BARBOSA, 1999), que poderia ser utilizada em substituição ao Timentin para eliminação de *Agrobacterium*. Para espécies como *Nicotiana tabacum* (NAUERBY et al., 1997; CHENG et al., 1998), *Lycopersicon esculentum* (LING et al., 1998) e *Solanum melogena* (BILLINGS et al., 1997), a adição de Timentin estimulou a regeneração.

Os efeitos positivos e negativos de antibióticos como Carbenicilina e Cefotaxima têm sido relacionados não apenas à sua toxidez, mas também ao seu efeito auxínico (LIN et al., 1995). O efeito hormonal desses antibióticos é mais evidente quando aplicados em pequenas quantidades, tendo em vista que ácido fenilacético é um dos produtos da degradação da Carbenicilina (HOLFORD e NEWBURY, 1992). O efeito da Carbenicilina se mostrou dependente do tipo de explante em tabaco (NAUERBY et al., 1997). Da mesma forma, a utilização de Cefotaxima aumentou a eficiência de plaqueamento de protoplastos em *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. incarnata* (D'UTRA VAZ et al., 1993; OTONI, 1995; OTONI et al., 1995). Entretanto, efeito promotor desse antibiótico não foi verificado em explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* (BARBOSA, 1999).

Em um protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium*, a utilização desses antibióticos para sua eliminação pode não apenas ser tóxica para as células vegetais, mas também pode alterar o balanço auxinas/citocininas, reduzindo a eficiência de regeneração e, por conseqüência, a freqüência de transformação (LIN et al., 1995). Esse fato deve ser levado em conta para maracujazeiro e experimentos envolvendo a avaliação dos efeitos do aumento da concentração de citocinina no meio de regeneração contendo Timentin ou outro antibiótico devem ser realizados.

Na transformação genética mediada por *A. rhizogenes* foi observado padrão semelhante na morfologia típica das raízes densamente pilosas obtidas para dicotiledôneas, habilidade de crescimento em meio de cultura na ausência de reguladores de crescimento, bem como na presença de antibióticos de seleção. À semelhança do observado para *P. edulis* f. *flavicarpa* (OTONI, 1995), houve regeneração espontânea de ramos, via organogênese direta a partir das raízes de *P. cincinnata*, inclusive com alongamento de algumas poucas gemas.

A principal via de regeneração para diversas espécies de *Passiflora* tem sido relatada como a organogênese, dentre elas para *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. molissima*, *P. giberti*, *P. amethystina* e *P. caerulea* (MORAN ROBLES, 1978, 1979; DORNELAS e VIEIRA, 1994; MANDERS et al., 1994; APPEZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; REIS et al. 2003; BECERRA et al., 2004;

MONTEIRO, 2005). A embriogênese somática para maracujazeiro havia sido relatada apenas para culturas de células em suspensão e de protoplastos derivados de suspensões celulares de *P. giberti* (OTONI 1995; ANTHONY et al., 1999).

Dentre as aplicações da transformação mediada por *A. rhizogenes* estão o aumento da capacidade rizogênica de clones e a redução do porte de clones (CHRISTEY, 1997), além de estudos relacionados à interação de microrganismos *in vitro*, dentre esses, os fungos micorrízicos (NISIZAKI, 1999). Por gerarem redução do porte das plantas, perda de dominância apical, alteração na morfologia foliar e floral, dentre outras alterações, genes *rol*, presentes nos plasmídeos Ri de *A. rhizogenes*, também têm recebido especial atenção por parte de pesquisadores interessados em melhorar ou desenvolver novas variedades de plantas ornamentais (CASANOVA et al., 2005).

Recentemente, foi relatado a transformação genética mediada por *A. rhizogenes* para pepino (*Cucurbita pepo*), em que algumas linhagens de raízes apresentaram proliferação de calos, acompanhada de diferenciação de embriões somáticos (BALEN et al., 2004). Anteriormente, formação de embriões também foi induzida por transformação com *A. rhizogenes* em mamão (CABRERA-PONCE, 1996), *Prunus avium* e cenoura (GUTIERREZ-PESCE et al. e DICOLA et al., citados por BALEN et al., 2004).

Em clones de alfafa com baixa sensibilidade ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético, a formação de embriões somáticos foi obtida apenas após a transformação dos tecidos e expressão dos genes *rol B* e *rol C* de *A. rhizogenes* (DUDITS et al., citado por ISHIZAKI et al., 2002). O aumento da expressão do gene *uidA* fusionado à região promotora do gene *rol C* foi evidenciado durante a embriogênese somática de cenoura, especialmente em embriões nos estádios cordiforme e torpedo (FUJII et al., 1994).

Não apenas o metabolismo de auxinas pode estar envolvido nessas respostas, já que a de adição de ácido giberélico, citada como imprescindível para indução de calo embriogênico em espinafre, não foi necessária em raízes transformadas com *A. rhizogenes* (ISHIZAKI et al., 2002).

Entretanto, a hipótese de que a embriogênese somática em *P. cincinnata* foi induzida pela transformação por *A. rhizogenes*, apesar de ser plausível, pode não estar correta, tendo em vista que antibióticos como Carbenicilina e Cefotaxima (cuja atividade auxínica já foi anteriormente discutida) promoveram o crescimento de calos embriogênicos e aumentaram a frequência de embriões somáticos a partir de raízes adventícias de mamoeiro (YU et al., 2001).

Apesar da amplificação por PCR, com *primers* específicos para o gene *gus*, indicarem a presença desse gene no DNA genômico extraído das folhas obtidas da transformação com *A. tumefaciens* Shooter, o ensaio histoquímico foi negativo. Em função disso, outros *primers* devem ser utilizados para confirmação da natureza transgênica das plantas, dentre eles o da transferase do isopentenil (*ipt*). A utilização de mutantes “Shooter” pode, teoricamente, eliminar a necessidade de seleção por meio de antibióticos uma vez que permite a eliminação do gene marcador (MIHÁLKA et al., 2003). A seleção positiva com o gene *ipt* foi utilizada com sucesso na transformação de tabaco e pimentão, onde os regenerantes apresentaram morfologia normal, sem a integração estável do gene *ipt* (MIHÁLKA et al., 2003).

A utilização de solução bacteriana com menor OD apresentou melhores resultados tanto para *A. rhizogenes* quanto para *A. tumefaciens*. O efeito tóxico da própria *Agrobacterium* é citado como maior obstáculo para transformação de videira (PERL et al., 1996). Assim, nas condições testadas, o emprego de concentração bacteriana menor é recomendável para *Passiflora*.

O presente trabalho demonstrou a viabilidade da transformação genética mediada por *Agrobacterium*, sendo a utilização de menores densidades bacterianas uma estratégia que deve ser observada nos protocolos de transformação para espécies do gênero.

A interação entre agentes gelificantes e antibióticos, bem como a influência desses sobre a morfogênese devem ser avaliados para cada espécie do gênero, haja vista as diferenças encontradas para *P. cincinnata* em comparação às obtidas para *P. edulis* f. *flavicarpa* (REIS, 2001).

A influência dos antibióticos sobre a embriogênese somática em *P. cincinnata* deve ser melhor avaliada, além da verificação da natureza transgênica dos embriões gerados em *P. cincinnata*, a qual já se encontra em andamento.

Experimentos de transformação genética envolvendo transformação de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata* com bactéria LBA 4404, contendo vetor pCAMBIA 1301, o qual confere resistência ao antibiótico Higromicina também encontram-se em andamento, já que constitui-se uma alternativa viável para o gênero, tendo em vista os dados aqui obtidos para *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (BARBOSA, 1999), além da alta resistência ao antibiótico Canamicina quanto a inibição da formação de ramos, já relatada para *P. edulis* f. *flavicarpa* (REIS, 2001).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; ZERBINI, F.M. & OTONI, W.C. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.33-38, 2005.
- APEZZATO-DA-GLORIA, B., VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- ARAGÃO, F.J.L., BRASILEIRO, C.M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.1-10, 2002.
- BALEN, B., LEIJAK-LEVANIĆ, D., MIHALJEVIĆ, S., JELENIĆ, S., JELASKA, S. Formation of embryogenic callus in hairy roots of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 182-187, 2004.
- BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 70 p. (Tese de Mestrado).
- BARROS, L.M.G., VIANA, A.A.B., CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.32, p.15-27, 2004.
- BECERRA, D.C., FORERO, A.P., GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.87-90, 2004.
- BIASI, L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.

- BRAZ, A.S.K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 106p. (Tese de Mestrado).
- CABRERA-PONCE, J., VEGASGARCIA, A., HERRERA-ESTRELA, L., Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology — Plant**, v.32, p.86-90, 1996.
- CASANOVA, E., TRILLAS, M.I., MOYSSET, L., VAINSTEIN, A. Influence of *rol* genes in floriculture. **Biotechnology Advances**, v.23, p.3-39, 2005.
- CHAUVIN, J.-E., MARHADOUR, S., COHAT, J., Le NARD, M. Effects of gelling agents on *in vitro* regeneration and kanamycin efficiency as a selective agent in plant transformation procedures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.58, p.213-217, 1999.
- CHENG, Z.M., SCHNURR, J.A., KAPUN, J.A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Plant Cell Reports**, v.17, p.646-649, 1998.
- CHEVREAU, E., MOURGUES, F., NEVEU, M., CHEVALIER, M. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaves of pear. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.33, 173-179, 1997.
- CHRISTEY, M.C. **Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation.** In: DORAN, P.M. (ed.) Hairy roots: culture and applications. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. p.99-111.
- COSTA, M.G.C., OTONI, W.C., MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 365-373, 2002.
- DORNELAS, M.C., VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.
- D'UTRA VAZ, F.B., SANTOS A.V.P, MANDERS, G., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical wood plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.

- FARIA, L C., SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.33, p.209-212, 1997a.
- FARIA, L.C., SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, n.32, p.1276-1277, 1997b.
- FUJII, N., YOKOYAMA, R., UCHIMIYA, H. Analysis of the *rolC* promoter region involved in somatic embryogenesis-related activation in carrot cell cultures. **Plant Physiology**, v.104, p.1151-1157, 1994
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A, OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GOMEZ-LIM, M., LITZ, R.E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant.**, v. 40, p. 442-449, 2004.
- 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**, v.48, p.673-680, 2000.
- HANSEN, G., WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.226-231, 1999.
- ISHIZAKI, T., HOSHINO, Y., MASUDA, K., OOSAWA, K. Explants of ri-transformed hairy roots of spinach can develop embryogenic calli in the absence of gibberellic acid, an essential growth regulator for induction of embryogenesis from non-transformed roots. **Plant Science**, v.163, p.223-231, 2002.
- KANTHARAJAH, A.S., DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, p.337-339, 1990.
- LAINE, E., LAMBLIN, F., LACOUX, J., DUPRE, P., ROGER, D., SIHACHAKR, D., DAVID, A. Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.77-80, 2000.
- LIN, J.-J. ASSAD-GARCIA, N., KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, v.109, p.171-177, 1995.
- LING, H.-Q., KRISELEIT, D., GANAL, M.W. Effect of ticarcillin/potassium clavulonate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**, v.17, p.843-847, 1998.

- LIU, Q., SALIH, S., HAMMERSCHLAG, F. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stems internodes. **Plant Cell Reports**, v.18, p.32-36, 1998.
- MANDERS, G., OTONI, W.C., D'UTRA VAZ, F.B., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Transformation of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.234-8, 1994.
- MIHÁLKA, V., BALÁZS, E., NAGY, I. Binary transformation systems based on 'shooter' mutants of *Agrobacterium tumefaciens*: a simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. **Plant Cell Reports**, v.21, p.778-784, 2003.
- MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 134p. (Tese de Doutorado).
- MONTEIRO, A.C.B.A., NAKAZAWA, G.T., MENDES, B.M.J., RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v.57, p.571-573, 2000.
- MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Baley. **Fruits**, v.33, p.693-699, 1978.
- MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeudes de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v.29, p.224-228, 1979.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAGAWA, J., CAVARIANI, C., AMARAL, W.A.N. Armazenamento de sementes de maracujá. **Revista Brasileira de Sementes**, v.13, p.77-80, 1991.
- NAUERBY, B., BILLING, K., WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v.123, p.169-177, 1997.
- NISIZAKI, S.M.A. **Associação *in vitro* de fungos micorrízicos arbusculares com raízes de maracujazeiro amarelo transformados com *Agrobacterium rhizogenes***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 40p. (Tese de Mestrado).
- OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese de Doutorado).

- OTONI W.C., CASALI, V.W.D., CECOM, P.R., MARIA, J., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Influência do antibiótico cefotaxima na cultura de tecidos de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres**, v. 42, p. 507-515, 1995.
- OTONI W.C., CASALI, V.W.D., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Expressão transitória do gene *gus* em maracujazeiro (*Passiflora giberti* N.E. Brown) mediada pelo bombardeamento de partículas. **Revista Ceres**, v.43, p.326-335, 1996.
- REIS L.B. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 89 p. (Tese de Mestrado).
- REIS, L.B., PAIVA NETO, V.B., PICOLI, E.A.T., COSTA, M.G.C., RÊGO, M.M., CARVALHO, C.R., FINGER, F.L., OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v. 39, p. 618-622, 2003.
- PASSOS, I.R.S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999. 128p. (Tese de Doutorado).
- PERL, A., LOTAN, O., M., A., HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, v.14, p.624-628, 1996.
- SILVA, M.B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 45p. (Tese de Mestrado).
- TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene *atacina a* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. 137p. (Tese de Doutorado).
- TEPFER, M., CASSE-BELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, v.4, p.24-28, 1987.
- WANG, A.S., EVANS, R.A., ALTENDORF, P.R., HANTEN, J.A., DOYLE, M.C. ROSICHAN, J.L. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.19, p.654-660, 2000.
- YU, T.-A., YEH, S.-D., YANG, J.-S. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.42, p.281-286, 2001.

CAPÍTULO III

Efeito de reguladores de crescimento e do tiosulfato de prata sobre a regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)

1. INTRODUÇÃO

A principal via de regeneração para diversas espécies de *Passiflora* tem sido relatada como a organogênese, dentre elas para *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. molissima*, *P. giberti*, *P. amethystina* e *P. caerulea* (MORAN ROBLES, 1978, 1979; DORNELAS e VIEIRA, 1994; APPEZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; REIS, 2001; REIS et al., 2003; BECERRA et al., 2004; MONTEIRO, 2005). A organogênese adventícia em maracujá é, em regra, direta e ocorre na superfície dos explantes. A utilização de 6-benzilaminopurina, geralmente em doses de 0,5 a 2 mg l⁻¹, tem sido amplamente empregada na indução adventícia de gemas e ramos *in vitro* em *Passiflora* (DORNELAS e VIEIRA, 1994; SILVA, 1998; BARBOSA, 1999; BIASI et al., 2000; HALL et al., 2000; REIS, 2001; BECERRA et al., 2004; MONTEIRO, 2005). Uma ampla revisão sobre explantes utilizados e as concentrações de reguladores utilizadas em diversas espécies de *Passiflora* pode ser obtida em COUCEIRO (2002).

DREW (1991), trabalhando com tecidos adultos e juvenis de diversas espécies de *Passiflora* testou várias combinações de reguladores para estabelecimento e propagação desses tecidos. Tecidos adultos de *Passiflora* são de difícil estabelecimento e propagação *in vitro*. Esse autor propôs uma combinação de reguladores para multiplicação de ramos, utilizando-se de segmentos nodais. Essa combinação tem como característica principal uma elevada relação citocinina:auxina (6:1).

A idade de explantes cotiledonares de maracujazeiro influenciou a frequência de explantes com ramos, bem como o número de ramos por explantes (HALL et al., 2000). A idade das plântulas também se refletiu na

resposta *in vitro* para explantes foliares de maracujazeiro, onde aquelas com dois meses de idade geraram um maior número de ramos por explante (BECERRA et al., 2004). Além desse dado, esses autores observaram que explantes de plantas mantidas em casa de vegetação tiveram melhor desempenho que plantas obtidas *in vitro*, bem como de material “revigorado” *in vitro*, proveniente de plantas adultas.

Em trabalho onde se avaliou a influência de reguladores de crescimento e, ou, de suas combinações na multibrotação e no alongamento de segmentos apicais de *P. edulis* f. *flavicarpa*, observou-se que apenas um dos meios testados foi eficiente na indução de multibrotação (REIS, 2001). Esse meio foi exatamente aquele proposto por DREW (1991). Também foi observado que uma proporção de folhas diferenciadas nos ramos axilares apresentava a característica de folhas adultas trilobadas, indicativas da mudança de fase no maracujazeiro-amarelo (REIS, 2001).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de reguladores de crescimento e do tiosulfato de prata na indução *de novo* de gemas e ramos a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares, bem como o padrão de folhas diferenciadas em gemas e brotações adventícias em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados explantes cotiledonares e segmentos de hipocótilos oriundos de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* germinadas em condições assépticas e enverdecidas por 15 dias. Os cotilédones tiveram as bordas cortadas e os explantes hipocotiledonares foram segmentados com aproximadamente 10 mm de comprimento.

Os explantes foram inoculados em meio de regeneração constituído de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l⁻¹ de mio-inositol e 3% (p/v) de sacarose, acrescido das combinações de reguladores de crescimento denominada de Drew, a saber: 2,15 mg l⁻¹ de cinetina, 4,15 mg l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,88 mg l⁻¹ de AIA (ácido 3-indolil acético) (DREW, 1991); ½Drew (reguladores de Drew na metade da concentração original) e 1 BAP (1 mg l⁻¹ de BAP). Todas essas combinações foram acrescidas de 0 ou 10 µM de tiosulfato de prata (STS), preparado conforme REID (1980). O meio foi gelificado com 2,5 g l⁻¹ de Phytigel™ (Sigma Chemical Company, USA) e teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As soluções de STS e AIA foram esterilizadas em filtro Millex-GS com poros de 0,22µm de diâmetro (Millipore, USA) e adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem (15 min a 121°C e pressão de 1,1 atm). Foram utilizadas placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm e 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil), para cultivo de segmentos de hipocótilo e de explantes cotiledonares, respectivamente. Dez explantes de hipocótilo e três explantes cotiledonares foram inoculados por placa, as quais foram vedadas com fita hipoalergênica Micropore® (3M do Brasil Ltda., Brasil).

A avaliação foi realizada aos 28 dias de cultivo, quando foram quantificados a frequência de regeneração e o número médio de ramos por

explante, sendo considerados aqueles com comprimento maior ou igual a 2 mm. Cada combinação de reguladores foi considerada um tratamento e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo o experimento repetido três vezes.

3. RESULTADOS

De maneira geral, os explantes cotiledonares geraram melhores resultados em comparação aos explantes de hipocótilo, sobretudo quanto ao número de ramos formados por explante (Figura 1). Explantes hipocotiledonares tratados com STS, por exemplo, formaram apenas um terço número de ramos formados em explantes cotiledonares.

A adição STS não causou alterações na frequência média de regeneração (FMR) em explantes cotiledonares (Figura 1A). A adição de STS contribuiu para o aumento nas médias de ramos por explante tanto para Drew quanto para 1BAP (Figura 1C). Porém, os explantes de hipocótilo foram mais sensíveis à adição de STS, havendo incremento na FMR e no número de ramos por explantes nas três combinações de reguladores testadas (Figura 1B e D). De um modo geral, o meio de Drew, na metade da força ($\frac{1}{2}$ Drew) e acrescido de STS, gerou melhores resultados nos dois parâmetros avaliados. Em comparação com 1BAP mais STS, o meio $\frac{1}{2}$ Drew gerou uma resposta mais homogênea nas três repetições realizadas desse experimento.

Interessantemente, foi observada mudança na forma, de mononlobada para trilobada, de algumas das folhas diferenciadas em explantes cultivados na combinação de reguladores do meio proposto por DREW (1991), principalmente quando utilizado em sua força total. Na Figura 3 pode-se observar o aspecto dos ramos regenerados e dessas folhas com formato alterado. As folhas diferenciadas em meio MS suplementado com 1 mg l^{-1} de BAP mantiveram-se, como era esperado, com a característica de folhas juvenis.

Apesar das frequências elevadas de regeneração adventícia de gemas, o alongamento dos ramos obtidos tanto em 1BAP quanto em $\frac{1}{2}$ Drew tem se

mostrado difícil. Em experimentos realizados, onde se avaliou influência de baixas doses de ácido indolil acético, zeatina e ácido giberélico, isoladamente ou em suas combinações, não foram obtidos resultados satisfatórios no alongamento nem o enraizamento desses ramos (dados não mostrados).

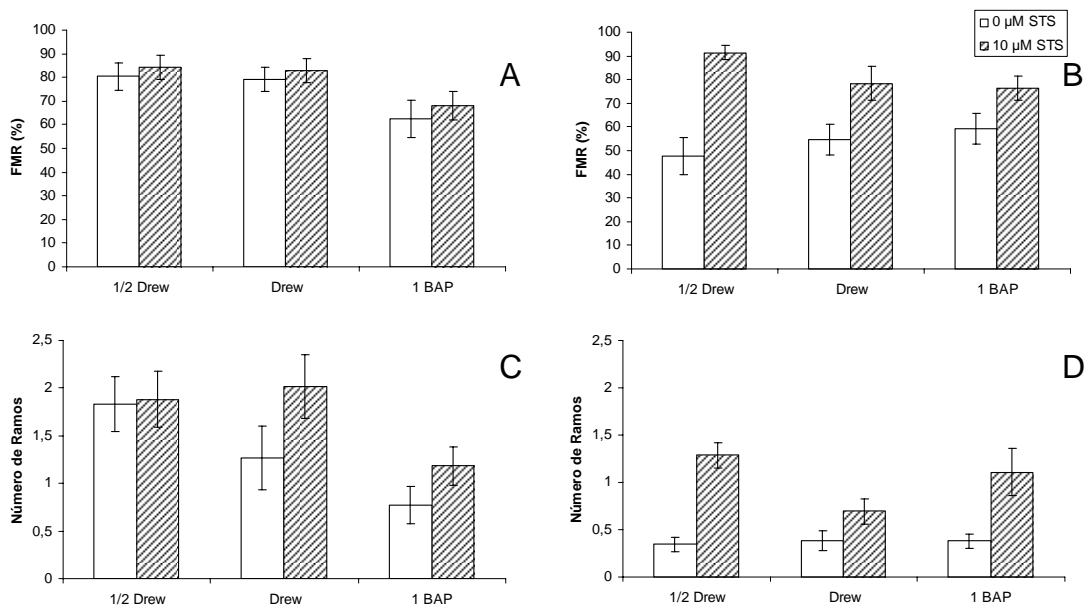


Figura 1 – Efeito de combinações de reguladores e do inibidor da ação do etileno tiosulfato de prata (STS) sobre morfogênese *in vitro* de explantes cotiledonares (A e C) e hipocotiledonares (B e D) de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A e B- Freqüência média de regeneração (FMR) de explantes cotiledonares e hipocotiledonares, respectivamente. C e D- Número de ramos por explante cotiledonar e hipocotiledonar, respectivamente. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

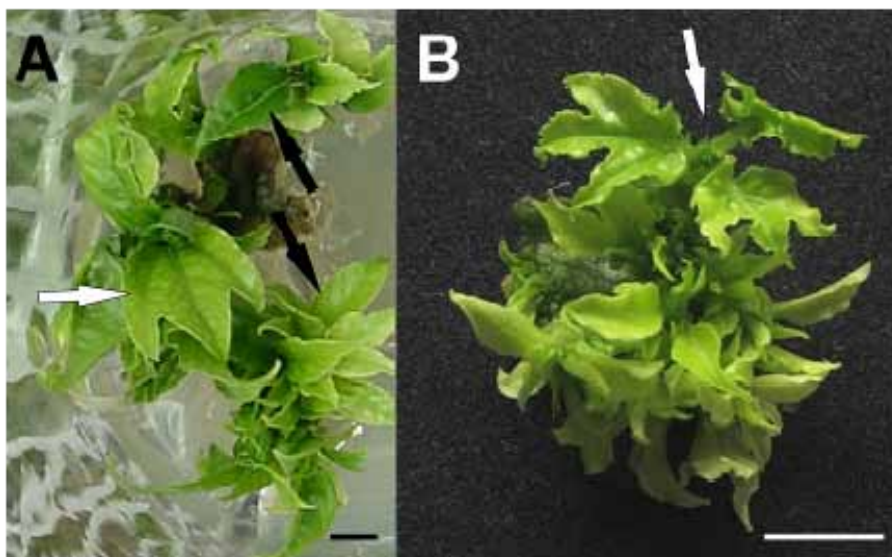


Figura 3 – Aspecto geral de explantes cotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* cultivados em $\frac{1}{2}$ Drew, com $10 \mu\text{M}$ de STS. **A-** Folha trilobada (seta branca) e folhas juvenis, monolobada (setas negras) **B-** Explante com ramo alongado com folhas trilobadas (seta). As barras correspondem a 10 mm.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, os segmentos hipocotiledonares mostraram-se mais sensíveis ao etileno que os explantes cotiledonares (Figuras 1 e 2).

É consenso na literatura que diferentes explantes têm mostrado respostas diferenciadas a reguladores de crescimento. Dessa forma, a avaliação dos efeitos do etileno em explantes cotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* devem ser realizados, pois não há dados na literatura para o efeito do etileno nesse explante em particular. Já havia sido demonstrado em maracujazeiro que a inibição da ação ou da biossíntese do etileno aumenta a frequência de regeneração e o número de ramos em explantes foliares e em segmentos de hipocótilo (FARIA e SEGURA, 1997; REIS, 2001). Além disso, o incremento da biossíntese de etileno via suplementação de ácido 1-animo-1-propano-carboxílico (ACC), reduz consideravelmente esses parâmetros (REIS, 2001).

O alongamento dos ramos obtidos tanto em 1 BAP quanto em $\frac{1}{2}$ Drew tem se mostrado difícil. Tal dificuldade, todavia, não foi relatada por alguns pesquisadores (DREW, 1991; DORNELAS e VIEIRA, 1994). A adição de água de coco (DORNELAS e VIEIRA, 1994) pode ser utilizada para se incrementar o alongamento dos ramos, bem como a redução progressiva da concentração de reguladores ao longo dos recultivos e subcultivos.

Via de regra, à exceção de REIS (2001), em todos relatos associados à cultura de tecidos do maracujazeiro *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* houve a formação de folhas monolobadas, típicas da fase juvenil dessa espécie. Era de se esperar a manutenção das características juvenis, uma vez que a maior parte dos trabalhos, incluindo o presente, utilizou como fonte de

explantes segmentos de hipocótilo ou cotilédones obtidos a partir de sementes germinadas em casa de vegetação ou *in vitro*.

Os presentes dados vêm reforçar o relato de mudança na morfologia foliar em brotações axilares de maracujazeiro-amarelo (REIS, 2001). Dessa forma, a alteração do formato foliar aqui observada foi, muito provavelmente, resultante da utilização de altas doses de citocininas em presença de baixas doses de auxinas, característica da combinação de reguladores proposta por DREW (1991).

Várias características estão associadas à transição de fases no desenvolvimento vegetal, dentre elas o florescimento, a heteroblastia, o vigor, a filotaxia, a habilidade de enraizamento, dentre outras. Portanto, as mudanças ocorridas em razão da troca de fase ao longo do desenvolvimento variam de espécie para espécie, sendo as maiores alterações de ocorrência no período que precede a maturidade fisiológica (HACKETT e MURRAY, 1993). O florescimento *in vitro* foi obtido *P. suberosa* em baixas doses de 6-BAP (SCORZA e JANICK, 1980). Contudo, florescimento foi obtido apenas em explantes provenientes de tecidos adultos, principalmente daqueles obtidos de posições mais distais nos ramos, portanto já determinados para florescimento; explantes juvenis e localizados abaixo do quinto nó não floresceram, mesmo em presença de BAP.

A mudança do formato das folhas, de mononlobadas para trilobadas, juntamente com o desenvolvimento de gavinhas, apresentada pelo maracujazeiro-amarelo, é um indicativo da mudança da fase juvenil para a fase adulta e até então não havia sido relatada sob condições *in vitro*. Essa observação abre possibilidade de pesquisas podendo ser um modelo para estudo de ontogenia vegetal e morfogênese foliar.

A regulação da morfogênese foliar, da formação do padrão de venação e do tamanho das folhas ainda não é bem compreendida, uma vez que esse controle é mais complexo do que o encontrado em outros órgãos, como em raízes e caules (POETHIG, 1997; DENGLER e KANG, 2001; TSUKAYA, 2003). Estudos nessa área têm utilizado principalmente mutantes para alteração do padrão de venação e formato foliar anormal (DENGLER e KANG, 2001; ROBLES et al., 2001), sendo que a análise desses mutantes com formato de folhas e da venação alterados indicam que um mecanismo comum controla

essas duas variáveis, com o transporte polar de auxinas desempenhando um papel central (DENGLER e KANG, 2001). Contudo, não apenas as auxinas são importantes para a morfogênese foliar, já que mutantes de *Arabidopsis* resistentes a citocininas (*cyr1*) apresentam anomalias nos ramos, com formação de poucas folhas e expansão reduzida de folhas e cotilédones (DEIKMAN e ULRICH, 1995).

Características como o número de lobos são determinadas nas fases mais iniciais do desenvolvimento foliar do que características como formato das células epidérmicas, densidade estomática e diferenciação das células do mesofilo (POETHIG, 1997). As características adultas ou juvenis da folha podem ser determinadas geneticamente, de modo semelhante à determinação da identidade dos órgãos florais, de tal forma que genes de identidade juvenis e adultos bloqueiam-se mutuamente, interferindo em programas mais elementares da morfogênese foliar (WEIGEL e MEYEROWITZ, citados por POETHIG, 1997).

Estudos empregando citometria de fluxo podem ser úteis na comparação dos tecidos adultos de plantas mantidas *in vivo* e os induzidos *in vitro*, uma vez que pode haver um gradiente na ploidia dos núcleos celulares ao longo da planta, característico para cada órgão ou fase ontogenética. BERGOUNIOUX et al. (1992) apresentam uma interessante revisão sobre o emprego dessa técnica.

Embora o etileno pareça não estar envolvido na alteração da forma foliar, visto que essa alteração foi observada nos tratamentos com e sem STS, outras avaliações devem ser realizadas.

A combinação de reguladores proposta por DREW (1991) pode substituir com sucesso o protocolo corriqueiramente utilizado na regeneração *in vitro* para maracujazeiro-amarelo (meio 1BAP) e servir de base para experimentos envolvendo otimização de protocolo de transformação genética utilizando explantes hipocotiledonares (**Capítulo IV**) e em outros experimentos envolvendo quantificação de etileno e de poliaminas (atualmente em andamento).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEZZATO-DA-GLORIA, B., VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 70 p. (Tese de Mestrado).
- BECERRA, D.C., FORERO, A.P., GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p. 87-90, 2004.
- BIASI, L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.
- COUCEIRO, M.A. **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 95 p. (Tese de Mestrado).
- DEIKMAN, J., ULRICH, M. A novel cytokinin-resistant mutant of *Arabidopsis* with abbreviated shoot development. **Planta**, v.195, p.440-449, 1995.
- BERGOUNIOUX, C. BROWN, S.C., PETIT, P.X. Flow cytometry and plant protoplast cell biology. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.374-386, 1997.
- DENGLER, N., KANG, J. Vascular patterning and leaf shape. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.50-56, 2001.
- DORNELAS, M.C., VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A, OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- HACKETT, W.P., MURRAY, J.R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M.R. (ed.). **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 93-105.
- HALL, R.M., DREW, R.A, HIGGINS, C.M., DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an australian passion fruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v.48, p.673-680, 2000.
- MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 134p. (Tese de Doutorado).
- MONTEIRO, A.C.B.A., NAKAZAWA, G.T., MENDES, B.M.J., RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v.57, p.571-573, 2000.
- MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Baley. **Fruits**, v.33, p.693-699, 1978.
- MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeudes de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v.29, p.224-228, 1979.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497. 1962.
- POETHIG, R.S. Leaf morphogenesis in flowering plants. **The Plant Cell**, v.9, p.1077-1087, 1997.
- REIS L.B. **Morfogênese *in vitro* de Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 89 p. (Tese de Mestrado).
- REIS, L.B., PAIVA-NETO, V.B., TOLEDO PICOLI, E.A., COSTA, M.G.C., RÉGO, M.M., CARVALHO, C.R., FINGER, F.L., OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.
- REID, M.S., PAUL, J.L., FARHOOMAND, M.B., KOFRANEK, A.M., STABY, G.L. Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.105, p.25-27, 1980.

- ROBLES, P., PEREZ-PEREZ, J.M., CANDELA, H. QUESADA, V. BARRERO, J.M. JOVER-GIL, S., PONCE, M.R., MICOL, J.L. Genetic architecture of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Developmental Biology**, v.4, p.50-56, 2001.
- SILVA, M.B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 45p. (Tese de Mestrado).
- TSUKAYA, H. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.57-62, 2003.

Efeito de enzimas pecto-celulolíticas sobre a regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)

1. INTRODUÇÃO

Diversos fatores influenciam a eficiência de um protocolo de transformação genética como a estirpe bacteriana utilizada (GIRI et al., 2001), a presença de substâncias indutoras da região *vir*, como acetosseringona e diversos outros fatores relacionados à resposta morfogenética dos tecidos (STACHEL et al., 1985).

A transformação genética de uma espécie vegetal depende não apenas de um protocolo de regeneração viável, mas também de que as células que participarão dos processos morfogenéticos sejam passíveis de transformação, ou seja, necessariamente tais células devem estar acessíveis a *Agrobacterium* ou às micro-partículas utilizadas no bombardeamento (GLOGOWSKI e GALSKY, 1978; LAPARRA et al., 1995).

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas no sentido de aumentar a eficiência de protocolos de transformação. A utilização de sonicação (SAAT – **S**onication-**A**ssisted *Agrobacterium*-mediated **T**ransformation) (TRICK e FINER, 1997; SANTARÉM et al., 1998), enzimas pecto-celulolíticas (ALIBERT et al., 1999; WEBER et al., 2003), “glass beads” (GRAYBURN e VICK, 1995) são alguns exemplos de metodologias que buscam maximizar a interação *Agrobacterium*-tecido vegetal, pois geram micro ferimentos no tecido vegetal, aumentando assim o número de sítios para infecção e estimulando a síntese de compostos que estimulam a transferência do T-DNA de *Agrobacterium*, pela ativação dos genes *vir* (STACHEL et al., 1985). Contudo, essas metodologias ainda são pouco difundidas e utilizadas pelos pesquisadores.

O protocolo de transformação genética mais comumente utilizado em *Passiflora* é o mediado por *Agrobacterium* (MANDERS et al., 1994; SILVA,

1998; BRAZ, 1999; HALL et al., 2000; MONTEIRO, 2005). Diversos problemas ainda persistem, como o pequeno número de ramos formados por explante, a baixa eficiência de transformação e o alto número de escapes gerados.

A regeneração *in vitro* em *Passiflora* geralmente se dá pela via direta (DORNELAS e VIEIRA, 1994), sendo restrita, sobretudo, à região do corte, nas extremidades dos explantes (BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000) ou na região da nervura central de explantes foliares (APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 1999; BECERRA et al., 2004).

Tal observação levou-nos a testar uma metodologia que estendesse para outras regiões dos explantes os eventos de regeneração *de novo*, gerando assim, um aumento no número de locais acessíveis para infecção por *Agrobacterium*.

O emprego de enzimas pecto-celulolíticas é uma opção bastante atraente, tendo em vista os resultados obtidos em girassol (ALIBERT et al., 1999; WEBER et al., 2003), pois não depende da aquisição de equipamentos e as enzimas utilizadas são as mesmas empregadas em protocolos de obtenção de protoplastos, ao contrário de outras metodologias como o SAAT. Além disso, o gênero *Passiflora* ainda carece de trabalhos que visem a otimização de protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium*, sendo o emprego de enzimas pecto-celulolíticas, com essa finalidade, ainda inédito na literatura para o gênero.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e meio de cultivo

Foram utilizadas plântulas de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, da variedade FB 100 (Viveiros Flora Brasil, Brasil) germinadas conforme (REIS, 2001). As sementes foram mantidas no escuro por 15 dias em estufa incubadora (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), na ausência de luz e a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, para germinação e estiolamento. Após esse período foram levadas para sala de crescimento, onde foram mantidas por mais 15 dias à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de cerca de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e fotoperíodo de 16 horas, para enverdecimento.

Os explantes constituíram-se de segmentos de hipocótilo com 10 mm de comprimento, aproximadamente.

O meio de regeneração utilizado, denominado ½Drew, constituiu-se de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l^{-1} de mio-inositol e 3% (p/v) de sacarose, acrescido de $10 \mu\text{M}$ de tiosulfato de prata (STS) e dos reguladores de crescimento utilizados por DREW (1991), na metade da concentração original, a saber: $1,075 \text{ mg l}^{-1}$ de cinetina, $2,075 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina), $0,44 \text{ mg l}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolacético). O meio foi gelificado com $2,5 \text{ g l}^{-1}$ de Phytigel™ (Sigma Chemical Company, USA) e teve o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. As soluções de STS e AIA foram esterilizadas em filtro Millex-GS com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro (Millipore, USA) e adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem (15 min a 121°C e pressão de 1,1 atm).

O STS foi preparado vertendo-se solução de tiosulfato de sódio em cristais de nitrato de prata, a uma proporção molar final de 4:1 (tiosulfato:prata) (REID et al., 1980).

2.2. Experimento 1: Efeito da enzima Macerozyme R-10 e de antibióticos na regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo

Soluções de 0,1 e 0,01% (p/v) de Macerozyme R-10 de *Rhizopus* sp. (Merck, Germany) foram preparadas em meio líquido, constituído de sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg l⁻¹ de mio-inositol e 3% (p/v) de sacarose, com pH ajustado para 5,8. Após diluição, as soluções foram centrifugadas (10 min em 5000 rpm a 5 °C) e esterilizadas em filtro Millex-GS com poros de 0,22µm de diâmetro (Millipore, USA).

Os explantes foram tratados, em condições assépticas, com 25 ml das soluções enzimáticas por 4 h a 28 °C e inoculados em meio de regeneração (item 2.1) e em meio seletivo, constituído de meio de regeneração acrescido de 250 mg l⁻¹ de Canamicina (Sigma Chemical Company, USA) e 300 mg l⁻¹ de Timentin[®] (Smithkline Beecham Brasil Ltda., Brasil). Explantes não tratados com Macerozyme foram utilizados como controle, inoculados em meio de regeneração e seletivo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada combinação enzima-meio de cultura foi considerada um tratamento, o qual constituiu-se de 4 placas de Petri de poliestireno cristal de 90 x 15 mm (J Prolab, Brasil) com dez explantes cada. O experimento foi repetido uma vez.

Também foi realizada transformação genética de explantes hipocotiledonares tratados e não tratados com solução 0,01% de Macerozyme, utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2301 (Cambia, Austrália) contendo os genes desaturase do fitoeno (PDS) e ciclase β do licopeno (LCY-B), da rota biossintética de carotenóides, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S (COSTA et al., 2002). A transformação genética foi realizada conforme protocolo descrito no item 2.4 do **Capítulo II**, exceto pela utilização de meio de co-cultivo suplementado com 1 mg l⁻¹ de BAP e meio seletivo suplementado com 1 mg l⁻¹ de BAP e 200 mg l⁻¹ de Canamicina e densidade bacteriana ajustada para 0,5 (λ=600nm).

2.3. Experimento 2: Efeito de combinações de enzimas pecto-celulolíticas na regeneração *in vitro* de maracujazeiro-amarelo

Soluções de 0,05 e 0,01% (p/v) de Macerozyme R-10, Driselase (Kyowa Hakko Kogyo Company, Japan) e Cellulase “Onozuka” R-10 (Yakult Honsha Company Ltd., Japan) e Macerozyme-Driselase, Macerozyme-Cellulase e Driselase-Cellulase a 0,01% (p/v) foram preparadas conforme item **2.2**.

Os explantes foram tratados por três horas a 28 °C com 25 ml de solução enzimática. Após o tratamento enzimático os explantes foram enxaguados em meio MS líquido e inoculados em meio de regeneração (item **2.2**), em placas de Petri de poliestireno cristal de 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil).

Foram realizados recultivos quinzenais, sendo o experimento avaliado no 45^o dia de cultivo quanto à frequência média de regeneração (FMR), FMR de gemas normais e número de ramos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo cada combinação enzimática considerada um tratamento, o qual foi composto de 5 placas de Petri com 6 explantes inoculados. O experimento foi repetido uma vez.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos no primeiro experimento, com o tratamento com Macerozyme (Figura 1), indicam que a concentração de 0,1% afetou negativamente a frequência média de regeneração (FMR). Foi observado que a concentração de Canamicina utilizada (200 mg l^{-1}) não foi suficiente para inibir a regeneração (Figura 1), bem como não houve interferência ou interação entre o tratamento enzimático e os antibióticos.

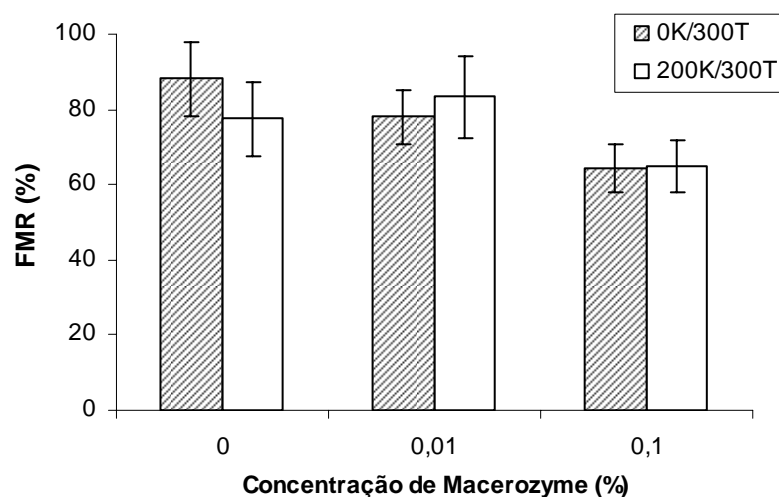


Figura 1 – Frequência média de regeneração de explantes de hipocótilos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* tratados com Macerozyme R-10 e cultivados em meio de regeneração contendo 0 ou 200 mg l^{-1} de Canamicina (0K ou 200K) e 300 mg l^{-1} de Timentin (300T). As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

Apesar de se ter realizado um experimento de transformação utilizando-se tratamento com Macerozyme a 0,01% (p/v), não foram obtidos transformantes, uma vez que o supercrescimento da *Agrobacterium* causou a morte das gemas e dos ramos formados (dados não mostrados).

No segundo experimento, a maior FMR foi obtida no tratamento controle (Figura 2A). A utilização das enzimas, na concentração de 0,01%, não afetou demasiadamente a regeneração, permitindo uma porcentagem de 60 a 73% de regeneração para as enzimas isoladas. Nos tratamentos com associação de enzimas, apenas o tratamento CD teve FMR superior a 60%.

A regeneração ao longo do explante foi bastante aumentada com o tratamento enzimático (Figura 2 B). Assim como o número de ramos por explante foi aumentado nos tratamentos com Macerozyme a 0,01% e CD (Figura 2 C), em relação ao controle. A maior redução foi observada no tratamento com Macerozyme a 0,05%.

Um aspecto geral da regeneração obtida pode ser vista na Figura 3. Apesar de haver um aumento na regeneração ao longo do explante, a quantidade de gemas mal formadas também foi aumentada (Figura 3 B).

Nos tratamentos onde houve decréscimo na FMR, essa redução foi causada pela senescência do explante ou pela morte do mesmo. De forma geral, esses explantes não-responsivos tinham o aspecto mostrado na Figura 3 D.

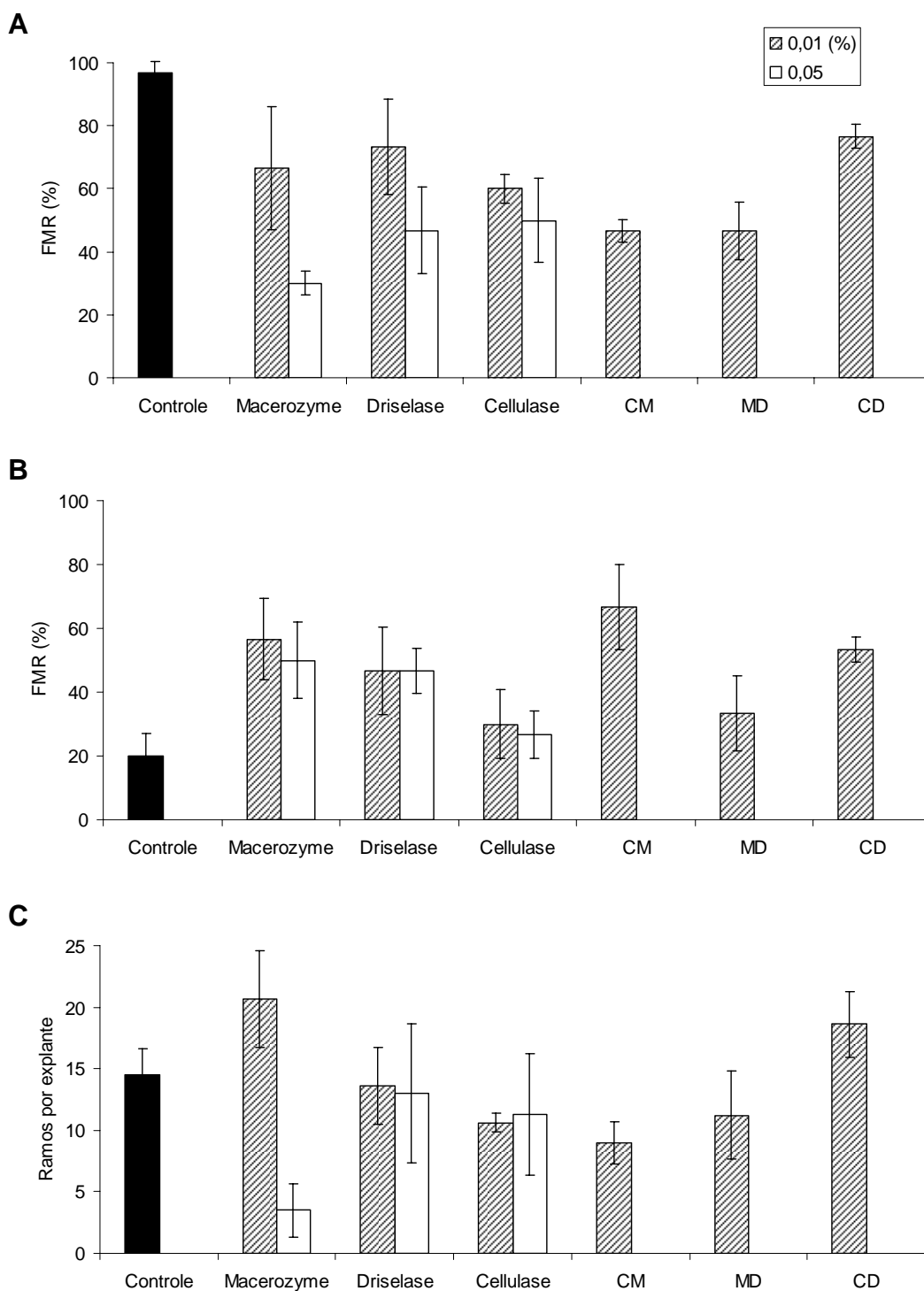


Figura 2 – Respostas morfológicas de explantes de hipocótilo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* tratados com enzimas pecto-celulíticas a 0,01 e 0,05% (p/v) e suas combinações a 0,01% (p/v). CM – Cellulase-Macerozyme R-10; MD – Macerozyme R10-Driselase; CD – Cellulase-Driselase. **A**- Frequência média de regeneração (FMR); **B**- Frequência média de regeneração ao longo do explante; **C**- Número médio de ramos por explantes. As barras verticais indicam os erros padrões das médias.

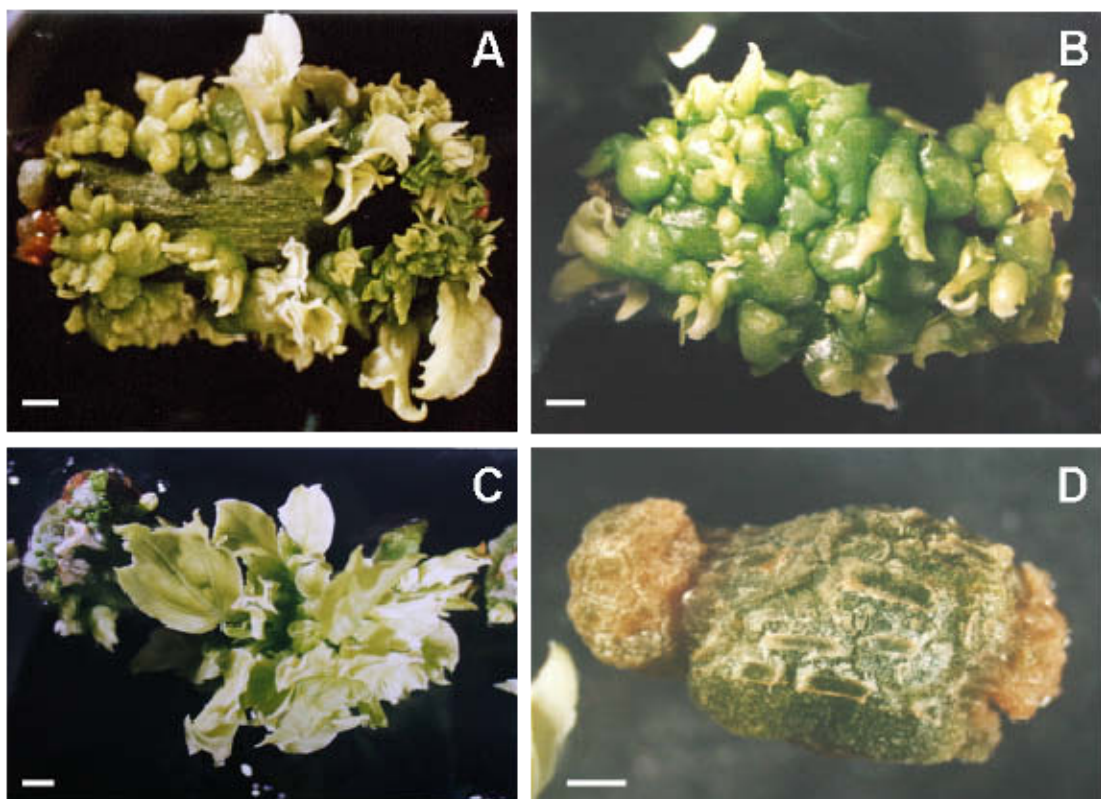


Figura 3 – Aspecto geral de explantes de hipocótilo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* tratados com enzimas pecto-celulolíticas. **A-** Cellulase 0,05%. **B-** Driselase 0,05% (p/v). **C-** Macerozyme R-10 0,01% (p/v). **D-** Macerozyme R-10 0,05% (p/v). As barras correspondem a 1 mm.

4. DISCUSSÃO

Explantos de hipocótilo de maracujazeiro-amarelo apresentam uma elevada resistência natural à Canamicina, sendo necessárias doses acima de 200 mg l⁻¹ para se obter inibição completa da regeneração *in vitro* de explantes de hipocótilo quando cultivados em Phytigel (REIS, 2001). A opção por uma menor pressão de seleção (200 mg l⁻¹) foi feita por se julgar que o estresse causado pelo agente seletivo seria potencializado pelo tratamento enzimático, o que não se confirmou, mesmo na concentração mais baixa da enzima (Figura 1).

Nas condições testadas, a concentração de 0,05% das enzimas foi, em geral, prejudicial à regeneração. Não só o tipo e concentração da enzima, mas também as condições de incubação dos explantes e o tempo de exposição à solução enzimática podem influenciar nas respostas *in vitro*. Resultados contrastantes foram obtidos em girassol quanto ao emprego de Macerozyme por quatro horas e por três dias (ALIBERT et al., 1999; WEBER et al., 2003). A permanência dos explantes por um período mais prolongado causou necrose e os mesmos não se desenvolveram. Dessa forma, parâmetros como a concentração e o tipo de enzima, o tempo e a temperatura de incubação devem ser ponderados, levando-se em conta as características dos explantes utilizados, para que a intensidade de degradação da parede celular não comprometa o processo de regeneração *in vitro*. Em *Passiflora*, soluções de Cellulase e Macerozyme (DORNELAS e VIEIRA, 1993; DORNELAS et al., 1995) ou Cellulase, Driselase e Macerozyme (D'UTRA VAZ et al., 1993; OTONI, 1995; OTONI et al. 1995a,b) foram, até agora, utilizadas apenas para obtenção de protoplastos.

As concentrações aqui utilizadas são cerca de 10 (Driselase) ou mesmo 100 vezes menores (Cellulase) do que as utilizadas por esses autores para a obtenção de protoplastos.

O tratamento enzimático foi bastante eficiente na indução de regeneração ao longo do explante (Figuras 3A e B). Esse aumento da área passível de infecção pelo *Agrobacterium* é um importante fator a ser considerado, sendo este o principal responsável pelo efeito benéfico do tratamento enzimático na transformação genética em girassol (WEBER et al., 2003). Além do aumento da área passível de infecção, há ainda a possibilidade do acesso da bactéria a regiões potencialmente regenerativas do explante também ser aumentada.

Contudo, esse não deve ser o fator para a escolha de um determinado tratamento em detrimento de outro. Embora o tratamento CM tenha sido o mais eficiente na indução de regeneração ao longo do explante, a regeneração como um todo foi diminuída, bem como o número de ramos formados. Dessa forma, é necessário que as células vegetais não apenas estejam acessíveis à infecção, já que esse é um pré-requisito indispensável para a infecção por *Agrobacterium* (GLOGOWSKI e GALSKY, 1978), mas que também mantenham sua capacidade regenerativa preservada.

O processo de infecção por *Agrobacterium* é iniciado pelo ferimento do tecido vegetal, o qual leva à liberação de substâncias fenólicas e de monossacarídeos que, por sua vez, vão estimular a expressão dos genes *vir* (SHENG e CITOVSKY, 1996). A ação das enzimas na parede celular pode, nesse caso, não apenas causar um aumento da área passível de infecção, mas também contribuir para ativação dos genes *vir*. Também é possível que oligossacarídeos liberados pela degradação da parede celular atuem diretamente na célula vegetal, promovendo a organogênese. Em explantes de camada fina de tecido de tabaco, oligossacarídeos derivados de parede celular alteraram a via regenerativa dos explantes, levando-os a desenvolverem gemas ao invés de flores ou calos, ou flores ao invés de gemas (TRAN THANH VAN et al., 1985), confirmando a influência dessas moléculas (oligossacarinas) na morfogênese vegetal. Uma breve revisão pode ser vista em CREELMAN e MULLET (1997).

A utilização de enzimas pecto-celulolíticas se mostrou uma melhor opção em girassol, quando comparada com SAAT. Esse último gerou melhores resultados na expressão transiente de GFP, mas o número de ramos transformados (expressão estável) foi menor que aquele obtido com o emprego do tratamento enzimático (WEBER et al., 2003). Esses autores obtiveram maior quantidade de ramos com reação GUS-positiva uniforme com Cellulase a 0,1 e Pectinase a 0,05% (p/v). Além disso, esses autores verificaram que a combinação dessas duas enzimas não só aumentou o número de ramos formados por explante, mas também promoveu um aumento no número de ramos com expressão uniforme de GUS. No presente trabalho, aumento no número de ramos formados por explante também foi verificado nos tratamentos com 0,01% de Macerozyme e com combinação Cellulase-Driselase.

Não apenas o incremento no número de ramos obtidos é um bom indicativo da potencialidade dessa metodologia para o gênero *Passiflora*, mas também a alteração no padrão da regeneração, que se estendeu ao longo do explante, ao invés de ficar restrita às extremidades distal e proximal dos explantes. Com isso, a possibilidade de ocorrer eventos de transformação independentes é aumentada, o que pode ser de grande valia num protocolo de transformação genética.

Os dados aqui apresentados servirão de base para novos testes e serão de grande utilidade, contribuindo para o estabelecimento e otimização de protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium* em *Passiflora*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBERT, B., LUCAS, O., LE GALL, V., KSLLRTHOGG, J., ALIBERT, G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.232-237, 1999.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B., VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- BECERRA, D.C., FORERO, A.P., GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.87-90, 2004.
- BIASI L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, v.57, p. 661-665, 2000.
- BRAZ, A.S.K. **Clonagem e seqüenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujazeiro-amarelo com construção derivada desses genes.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 106p. (Tese de Mestrado).
- COSTA, M.G.C., OTONI, W.C., MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and the production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v.21, p.365-373, 2002.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**, v.9, p.1211-1223, 1997.

- DORNELAS M.C., TAVARES, F.C.A., OLIVEIRA, J.C., VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v.15, p. 106-110, 1995.
- DORNELAS M.C., VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p. 103-106, 1993.
- DORNELAS M.C., VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p. 211-217, 1994.
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.
- D'UTRA VAZ, F.B., SANTOS A.V.P, MANDERS, G., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical wood plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A, OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GIRI, A., RAVINDRA, S.T., DHINGRA, V., NARASU, M.L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. **Current Science**, v.81, p.378-382, 2001.
- GLOGOWSKI, W, GALSKEY, A.G. *Agrobacterium tumefaciens* site attachment as a necessary prerequisite for crown gall tumor formation on potato discs. **Plant Physiology**, v.61, p.1031-1033, 1978.
- GRAYBURN, W.S., VICK, B.A. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. **Plant Cell Reports**, v.14, p.285-289, 1995.
- LAPARA, H., BURRUS, M., HUNOLD, R., DAMM, B., BRAVO-ANGEL, A., BRONNER, R., HAHNE, G. Expressin of foreign genes in sunflower (*Helianthus annus* L.) – evaluation of three gene transfer methods. **Euphytica**, v.85, p.63-74, 1995.
- MANDERS, G., OTONI, W.C., D'UTRA VAZ, F.B., BLACKHALL, N.W., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.697-702, 1994.
- MONTEIRO A.C.B.A., NAKAZAWA, G.T., MENDES, B.M.J., RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, v.57, p. 571-573, 2000.

- MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando a resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 134. (Tese de Doutorado).
- 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**, v.48, p.673-680, 2000.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese de Doutorado).
- OTONI W.C., CASALI, V.W.D., CECON, P.R., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Regeneração de Plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres** **42**, p. 461-468, 1995a.
- OTONI W.C., CASALI, V.W.D., CECON, P.R., MARIA, J., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Influência do antibiótico cefotaxima na cultura de tecidos de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres** **42**, p. 507-515, 1995b.
- REIS L.B. **Morfogênese *in vitro* de Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 89 p. (Tese de Mestrado).
- SANTARÉM, E.R, TRICK, H.N., ESSIG, J.S., FINER, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, V.17, p.752-759, 1998.
- STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M., ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v.318, p.624-629, 1985.
- SHENG, J., CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, p.1699-1710, 1996.
- SILVA, M.B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 45p. (Tese de Mestrado).

- TRAN THANH VAN, K., TOUBART, P., COUSSON, A., DARVILL, A.G., GOLLIN, D.J., CHELF, P., ALBERSHEIM, P. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. **Nature**, v.314, p.615-617, 1985.
- TRICK, H.N., FINER, J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v.6, p.329-336, 1997.
- WEBER, S, FRIEDT, W, LANDES, N., MOLINIER, J, HIMBER, C, ROUSSELIN, P., HAHNE, G, HORN, R. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. **Plant Cell Reports**, v.21, p.475-482, 2003.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

- Maior frequência de germinação normal em *P. cincinnata* foi obtida em meio MS força total.

- Para regeneração em *P. cincinnata* os melhores resultados foram obtidos em meio MS suplementado com 0,5 mg l⁻¹ de BAP e 10% (p/v) de água de coco em meio gelificado com ágar ao invés de *gellan gum*.

- Embriogênese somática foi observada no tratamento cujo meio foi suplementado apenas com água de coco.

- Os calos obtidos nesse tratamento foram bastante proliferativos e os embriões formados em geral normais. A germinação desses embriões gerou plântulas normais que puderam ser aclimatadas.

- Explantes hipocotiledonares se mostaram bastante resistentes à aos antibióticos Higromicina e Canamicina. A Higromicina foi menos ativa em meio gelificado com ágar Vetec em comparação com o meio gelificado com Phytigel.

- Solução de *Agrobacterium* com OD₆₀₀ ajustada para 0,25 se mostrou mais eficiente para a transformação.

- Em raízes transformadas de *P. cincinnata* foi observada a formação de gemas e embriogênese somática.

- Plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, transformadas com *A. tumefaciens* SHOOTER, regeneradas em meio sem reguladores de crescimento não apresentaram reação positiva para *gus*, embora a reação de PCR com *primers* específicos, tenha indicado a presença desse gene no DNA genômico das plantas regenerada.

- Combinação de reguladores proposta por DREW pode ser usada, com vantagens, na indução *de novo* de gemas adventícias em explantes cotiledonares e hipocotiledonares

- O acréscimo de 10 μM de STS incrementou o número de ramos formados, principalmente em explantes de hipocotiledonares.

- O tratamento com enzimas pecto-celulolíticas foi bastante eficiente na indução de regeneração ao longo do explante.

- Os resultados aqui apresentados abrem novas perspectivas para a embriogênese somática, bem como novas contribuições para a regeneração *in vitro* e transformação genética no gênero *Passiflora*.