

CRISLENE VIANA DA SILVA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, ORGANOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Passiflora cincinnata* E *P. edulis***

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
2009**

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

T

S586g
2009

Silva, Crislene Viana da, 1979-

Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* / Crislene Viana da Silva. – Viçosa, MG, 2009.
xv, 82f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Maracujá - Propagação *in vitro*. 2. Agrobacterium.
3. Vedação (Tecnologia). 4. Agentes ativos de superfícies.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.423

CRISLENE VIANA DA SILVA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, ORGANOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Passiflora cincinnata* E *P. edulis***

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 agosto 2009.



Prof.^a Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)



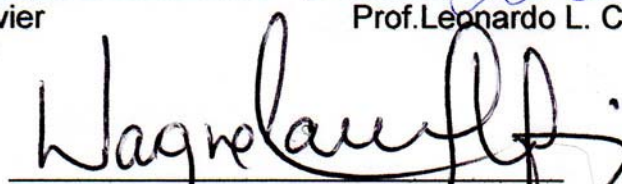
Prof. Cláudio Horst Bruckner



Prof. Aloisio Xavier



Prof. Leonardo L. Carnevalli Dias



Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

À Deus;

Aos meus pais Raimundo (*in memoriam*) e Joana;

Ao meu irmão Cristiano;

Ao Virgílio;

Aos meus amigos(as).

OFEREÇO E DEDICO.

“Nunca existiu uma grande inteligência sem uma veia de loucura”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Deus, maior responsável pelo êxito deste trabalho e a verdadeira essência da vida, por me conceber a oportunidade de viver buscando conhecer e acreditar na sua imensa bondade, sobretudo estando sempre ao meu lado e guiando meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Professor Wagner Campos Otoni, pela amizade, pela orientação profissional, pelos ensinamentos e pelo empenho e cumplicidade na realização desta tese.

Aos Professores Aloisio Xavier, Cláudio Horst Bruckner, Luzimar Campos da Silva e Leonardo Carnevalli Dias pela disponibilidade e pelas críticas e sugestões ao trabalho.

À Elisonete (Lili), pela amizade e boa vontade em ajudar sempre e pelo carisma.

Aos bolsistas de iniciação científica Leandro e Virgílio, pela dedicação na execução dos experimentos, o meu agradecimento especial por estarem sempre dispostos a me auxiliar, pela oportunidade de podermos trabalharmos juntos, pela amizade e pelo profissionalismo no desenvolvimento de todo o trabalho

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, por compartilharmos momentos agradáveis, e pela amizade.

“Amizade compreende coisas que as palavras não podem expressar”... Agradeço a amizade, as palavras de incentivo, os momentos alegres compartilhados e o carinho das minhas amigas(os) e companheiras(os): Viviane, Flavia, Daniela, Iulla, Nathalia, Maria Andreia, Bia, Roberta, Elyabe,

Leandro, Virgilio, Malu, Léo (batata), Jaqueline, Cynthia, Joseila, Ana Paula, Simone, José Maria, Alice, Marilaine, Priscila, Thuly, Baroa, Larissa, Léo Corrêa, Thao, Tiaguinho.

À minha mãe, sempre amável e querida, pela sua dignidade, por ter estado sempre ao meu lado e pelos ensinamentos e educação que me passou, sobretudo para eu ter esperança, fé e amor e acreditar na vida, fortalecendo-me rumo a mais uma importante conquista profissional.

Ao meu irmão Cristiano, por estar sempre ao meu lado, com toda a sua alegria e constante apoio.

A todos os meus colegas com quem convivi no decorrer do Curso e a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

CRISLENE VIANA DA SILVA, filha de Raimundo Rodrigues da Silva e Lina Joana Viana da Silva, nasceu em Ibitaré, MG, em 26 de abril de 1979.

Em 2003, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2005.

Neste mesmo ano, ingressou no programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal em nível de Doutorado da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o Doutorado em 13 de agosto de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x	
LISTA DE TABELAS	xii	
RESUMO	xiii	
ABSTRACT	xv	
INTRODUÇÃO GERAL	1	
REFERÊNCIAS	4	
CAPÍTULO I		
EFEITO DO TIPO DE VEDAÇÃO DO FRASCO NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE MARACUJAZEIROS (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. e <i>P. cincinnata</i> Mast.)		7
1. RESUMO	7	
2. INTRODUÇÃO	8	
3. MATERIAL E MÉTODOS	10	
3.1 - Material vegetal	10	
3.2 - Germinação das sementes <i>in vitro</i>	10	
3.3 - Delineamento experimental	11	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12	
4.1 - Efeito dos sistemas de vedação sobre a germinação	12	
4.2 - Efeitos dos sistemas de vedação sobre a altura das plântulas	14	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20	
CAPÍTULO II		
Explantos radiculares: uma fonte alternativa de organogênese <i>in vitro</i> para maracujazeiros		23
1. RESUMO	23	
2. INTRODUÇÃO	25	
3. MATERIAL E MÉTODOS	27	
3.1 - Material vegetal	27	
3.2 - Organogênese <i>in vitro</i>	28	
3.3 - Alongamento e enraizamento dos ramos	28	
3.4 - Avaliação do experimento	28	
3.5 - Estudo anatômico e caracterização ultraestrutural da organogênese <i>in vitro</i>	29	
3.6 - Avaliação da quantidade de DNA por citometria de fluxo	29	
3.7 - Análise estatística	30	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44	

CAPÍTULO III	
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. e <i>P. cincinnata</i> Mast. MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>A. rhizogenes</i>	
.....	48
1. RESUMO	48
2. INTRODUÇÃO	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 - Material vegetal	52
3.2 - Germinação das sementes in vitro e obtenção dos explantes.....	52
3.3 - Linhagem e multiplicação bacteriana em meio de cultura	53
3.4 - Infecção bacteriana e cultura de raízes transformadas	53
3.5 - Cultivo de raízes transformadas	54
3.6 - Obtenção das plantas transgênicas	55
3.7 - Isolamento de DNA e análise de PCR.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 - Influência dos antibióticos meropenem, timentin e cefotaxima na morfogênese de hipocótilos.....	57
4.2 - Confirmação das plantas transgênicas via PCR.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CAPÍTULO IV	
EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE PLURONIC® F-68 NA REGENERAÇÃO in vitro DE HIPOCÓTILOS DE MARACUJAZEIROS (<i>Passiflora edulis</i> f. SIMS. <i>flavicarpa</i> DEG. E <i>P. cincinnata</i> MAST.).....	
.....	71
1. RESUMO	71
2. INTRODUÇÃO	72
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.1 - Material vegetal	74
3.2 - Germinação das sementes in vitro e obtenção dos explantes.....	74
3.3 - Suplementação do Pluronic® F-68 na organogênese em hipocótilos.....	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CONCLUSÃO GERAL	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	PÁGINA
Médias das percentagens de germinação para os diferentes sistemas de vedação das espécies <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. e <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg. (FB 100, FB 200 e FB 300). ESP = embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano; PPH = placa de Petri com fita hipoalergênica, PVCM = filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC com dois filtros MilliSeal [®] ; PVC = filme plástico de PVC. Barras = erros-padrão das médias.	13
Influência de diferentes tipos de vedação na germinação de sementes de maracujá <i>in vitro</i> , aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> . A. embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano, B. placa de Petri com fita hipoalergênica (Micropore [®] 3M), C. filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear [®]) com dois filtros MilliSeal [®] D. filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear [®]).	15
CAPITULO II	
Organogênese direta em explantes radiculares na fase de indução aos 30 dias de cultivo em meio MS semi-sólido suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BA de: A, B. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> FB 100; C, D. <i>P. cincinnata</i> . Barras: 0,5 cm.	31
Explantes radiculares inoculados em meio MS suplemento com 4,44 µM de BA. A,B. Protuberâncias (setas) formadas diretamente no explante <i>Passiflora cincinnata</i> aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> . C-H. <i>Passiflora edulis</i> genótipos FB 100 e FB 300 aos 20 e 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> com gemas e primórdios foliares (setas, figuras E-F) formadas diretamente dos explantes radiculares. Barras: A,C,D = 100 µm; B,E,F,G,H = 200 µm.	34
Organogênese direta de explantes radiculares de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. A-B, e <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg. genótipos FB 100 e FB 300 C-F. Cortes longitudinais dos explantes radiculares inoculados em meio MS suplementado com 4,44 µM de BA. A. explante radicular com modificações celulares no córtex dando origem a brotação. B. Detalhe da organogênese direta. C,D. modificações celulares dando origem as brotações. E,F. detalhe das brotações. BR- brotações, setas – divisões celulares. Barras: A, C, E, F = 0,5 mm; B, D = 0,3 mm.	36
Fase de alongamento das brotações em meio MS líquido suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de GA3, após 10 dias. A,B. Brotações de <i>Passiflora cincinnata</i> . C,D. Brotações de <i>Passiflora edulis</i> . Barras A,C,D = 1 cm; B = 0,5 cm.	37

Enraizamento em substrato de fibra de coco e Plantmax (1:1) de brotações alongadas provenientes da organogênese *in vitro* de explantes radiculares. **A,B.** *Passiflora cincinnata* Mast. **C,D.** *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. Barras = 1 cm 38

Plantas aclimatizadas, aos 120 dias, advindas da organogênese *in vitro* em explantes radiculares. **A.** *Passiflora cincinnata* Mast; **B.** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* FB 100; **C.** *P. edulis* f. *flavicarpa* FB 200. Barra = 5 cm 39

Histogramas de citometria de fluxo de plantas aclimatizadas obtidas mediante germinação *in vitro* (Controles: A, C, E e G) de *Passiflora cincinnata* (**A**; 2,98 pg), *P.edulis* f. *flavicarpa* FB100 (**C**; 3,27 pg), FB 200 (**E**; 3,28 pg) FB300 (**G**; 3,28 pg), e de organogênese adventícia a partir de explantes radiculares de *P. cincinnata* (**B**; 2,99 pg), FB100 (**D**; 3,27 pg), FB200 (**F**; 3,28 pg) e FB300 (**H**; 3,29 pg). O primeiro pico em cada histograma corresponde ao padrão interno *Glycine max* cv. Polanka (2,5 pg). 42

CAPITULO III

Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de raízes “hairy root” de *Passiflora edulis* infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* R1601 contendo a construção quimérica *nos-nptII-nos*, e controles, amplificados por PCR. Fragmentos de 550 pb confirmam a presença do transgene. (M) é o marcador padrão de 100 pb; transformantes da planta de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 59

Aspecto de explantes de hipocótilo de *Passiflora edulis* inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes*. A. hipocótilos inoculados com raízes em meio MS desprovido de antibiótico e regulador vegetal. B,C. detalhes das raízes transformadas. 61

Análise eletroforética de produtos de amplificação via PCR em gel de agarose do DNA genômico de folhas de *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata* infectadas com *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo a construção quimérica *nos-nptII-nos*, e controles. Fragmentos de 550 pb confirmam a presença do transgene. (M) é o marcador padrão de 100 pb; (C+) representa o controle positivo e (c-) o controle negativo das plantas de *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata*, respectivamente 63

Aspecto de explantes transformados de *Passiflora edulis* inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. A. hipocótilos cultivados em meio seletivo MS suplementado com 300 mg L-1 de timentin e 6 mg L-1 de higromicina. B. detalhe da brotação em explantes de hipocótilo. C,D. plantas transformadas colocadas para enraizar em substrato fibra de coco. 63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	PÁGINA
Valores médios de germinação (%) por frasco de quatro genótipos de maracujazeiros <i>Passiflora cincinnata</i> (PC), 'FB 100', 'FB 200' e 'FB 300 para os diferentes sistemas de vedação	12
Valores médios em centímetro da altura de plântulas das espécies <i>Passiflora cincinnata</i> (PC) e <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (FB 100, FB 200 e FB 300) para os diferentes tipos de vedação	16
Valores médios de comprimento de raízes em centímetro de plântulas para os diferentes sistemas de vedação em quatro diferentes genótipos de maracujazeiros.	16
Valores médios de comprimento de raízes de plântulas para os diferentes sistemas de vedação em quatro diferentes genótipos de maracujazeiros.	17
CAPITULO II	
Número médio de brotações em <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. (PC) e <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg. ('FB 100', 'FB 200' e 'FB 300') em três períodos de avaliação.	32
Médias da quantidade de DNA determinada por análise de citometria de fluxo de plantas regeneradas via explantes radiculares de maracujazeiros <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. e <i>Passiflora edulis</i> Sims. f. <i>flavicarpa</i> Deg. (FB 100, FB 200 e FB300)	41
CAPÍTULO III	
Médias de brotações regeneradas <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações dos antibióticos meropenem, timentin e cefotaxima em explantes hipocotiledonares das espécies <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. (PC) e <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg. (FB 100, FB 200 e FB 300)	57
CAPÍTULO IV	
Número total de brotações adventícias em explantes hipocotiledonares de <i>Passiflora cincinnata</i> (PC) e <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> genótipos FB 100, FB 200 e FB 300 induzidos em MS suplementado com 6-BA 2,35 μ M nas concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 0,5 % de Pluronic® F-68	76

RESUMO

SILVA, Crislene Viana da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009. **Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Luzimar Campos da Silva e Maria Catarina Megumi Kasuya.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo da influência de diferentes vedações na germinação *in vitro*, o estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de explantes radiculares, a implementação de um protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*, além de testar diferentes concentrações do surfactante Pluronic[®] F68 na regeneração de duas espécies de maracujazeiros (*Passiflora cincinnata* Masters e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. Quanto a germinação *in vitro*, os sistemas de vedação mais efetivos para proporcionar maior comprimento de hipocótilos e de raízes foram as embalagens sanfonadas de polipropileno com filtro microbiano e placa de Petri com fita hipoalergênica, por promoverem trocas gasosas mais efetivas e conseguinte produção de plântulas mais vigorosas. A organogênese em explantes radiculares em *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* ocorreu pela via direta, confirmada por estudos anatômicos e pela microscopia eletrônica de varredura. Ficou evidenciada a diferenciação de brotações a partir das células do câmbio vascular com intensas divisões celulares no plano periclinal e com típica conexão vascular com os explantes. As respostas dos genótipos estudados ocorreu em épocas diferentes, sendo um processo assincrônico no qual a suplementação do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BA) ao meio de cultivo é indispensável para a resposta organogênica de explantes radiculares. Brotações induzidas em meio semi-sólido e alongadas em meio líquido sob agitação foram enraizadas em substrato de fibra de coco e Plantmax[®] (1:1), e aclimatizadas com sucesso. A citometria de fluxo indicou que não houve variação na quantidade de DNA dos regenerantes aclimatizados de todos os genótipos. A quantidade de DNA (pg) nos regenerantes de *P. cincinnata* (2,99 pg) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (3,26-3,28 pg) foram compatíveis com as quantidades de DNA das plantas controle, obtidas por via seminífera. Transformação genética de maracujazeiro utilizando *Agrobacterium rhizogenes* R1601 carregando a construção quimérica *nos-nptII-*

nos, o qual confere resistência à canamicina, e *A. tumefaciens* GV3101 carregando o gene *APETALA* com construção quimérica *pROKII-AP1-GUSint*, conferindo resistência à higromicina. Para a eliminação das agrobactérias após a fase de pré e co-cultivo, os antibióticos Meropenem e Cefotaxima foram mais efetivos na eliminação das bactérias, não interferindo na regeneração adventícia. O diagnóstico de PCR confirmou a presença do T-DNA e Ri-TDNA em todos os transformantes de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Esse sistema mostra-se promissor para o estudo de genes com funções desconhecidas, bem como o estudo dos genes envolvidos na via da arquitetura floral, e também a facilidade de manipulação das raízes “hairy root” e a possibilidade de regeneração adventícia de brotações e de plantas transformadas. A utilização de Pluronic[®] F-68 na regeneração de brotos mostrou-se eficiente, sendo que para a espécie *P. cincinnata* as concentrações mais eficientes foram as mais baixas do surfactante (0,001 e 0,01%) enquanto que para *P. edulis* f. *flavicarpa* a resposta variou entre os genótipos estudados.

ABSTRACT

SILVA, Crislene Viana da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August of 2009. **Germination *in vitro*, organogenesis in root explants and genetic transformation of *Passiflora cincinnata* and *P. edulis*.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Luzimar Campos da Silva and Maria Catarina Megumi Kasuya.

The present work aimed to study the influence of different type of sealing material on the *in vitro* germination, the establishment of a protocol for root explants *in vitro* regeneration, the implementation of a *Agrobacterium rhizogenes* and *A.tumefaciens*-mediated transformation protocol, besides to test different concentrations of the surfactant Pluronic[®] F68 in the regeneration of two passionfruit species (*Passiflora cincinnata* Masters and *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener genotypes FB 100, FB 200 and FB 300). The most effective systems of sealing material to provide greater hypocotyls and roots length were the concertina packaging of polypropylene with microbial filter and the petri dish with hypoallergenic tape, by promoting more effective gas exchange and therefore produce more vigorous seedlings. The organogenesis in *P. cincinnata* and *P.edulis* f. *flavicarpa* root explants occurred through direct way, confirmed by anatomical studies and scanning electron microscopy. It evidenced the differentiation of shoots from the the vascular cambium cells with intense periclinal cell divisions and with typical vascular connection with the explants. The responses of the studied genotypes occurred at different periods, and is an asynchronous process in which the supplementation of 6-benzylaminopurine (BA) plant growth regulator to the culture medium is essential for the organogenic response of root explants. Induced shoots in semi-solid medium and elongated in liquid medium under agitation were rooted in coconut-fiber substrate and Plantmax[®] (1:1), and successfully acclimatized. Flow cytometry indicated that there was no variation in the DNA amount of acclimatized regenerating of all genotypes. The DNA amount (pg) in regenerating of *P. cincinnata* (2.99 pg) and *P. edulis* f. *flavicarpa* (3,26-3,28 pg) were consistent with the DNA amounts from control plants, obtained by seminiferous via. The protocol presented can be useful as explants alternative for use in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of passionfruit. In the genetic transformation using *A. rhizogenes* R1601 carrying the chimeric construction

nos-nptII-nos, which confers resistance to kanamycin, and *A. tumefaciens* GV3101 carrying the gene *APETALA* with the chimeric construction *pROKII-AP1-GUSint*, conferring resistance to hygromicina, for the *Agrobacterium* elimination after the phase of pre-and co-cultivation, the antibiotics Meropenem and cefotaxime were more effective, not interfering with the adventitia regeneration. The PCR diagnosis confirmed the presence of T-DNA and Ri-TDNA in all transformants of *P. cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. This system seems to be promising for the study of genes with unknown functions, as well as the study of genes involved in the floral architecture pathway, and also the facility of the roots "hairy root" handling and the possibility of adventitious shoots regeneration of the transformed plants. The use of Pluronic® F-68 in the shoots regeneration was efficient, whereas for the *P. cincinnata* species most effective concentrations were the lowest ones (0.001 and 0.01%) while for *P. edulis* f. *flavicarpa* the response varied among the studied genotypes. The answers differ statistically regarding the control, being the most effective response for the *P. edulis* f. *flavicarpa* species the concentration of (0.01 and 0.1%). So the addition of Pluronic® F-68 was effective in shoots induction for the studied species.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Passifloraceae encontra-se largamente distribuída nos trópicos e inclui mais de 630 espécies das quais a maior parte pertence ao gênero *Passiflora* e habita as regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (Oliveira, 1987; Van der Plank, 1996).

A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional, sendo que a evolução da produção do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial. Contudo, a produtividade nacional ainda é baixa, com cerca de 14 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (IBGE, 2006), devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência de cultivares superiores.

A cultura de tecidos é uma importante e promissora ferramenta para estudos correlacionados ao gênero *Passiflora*, dentre eles *Passiflora cincinnata* Mast. e a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. A cultura de tecidos no gênero *Passiflora* iniciou-se com a produção de brotações adventícias no cultivo de segmentos de caule de plantas adultas de *P. caerulea* realizado por Nakayama (1966). Atualmente, as várias técnicas de cultura de tecidos têm sido relatadas para um número crescente de espécies de maracujazeiro conforme revisto por Vieira & Carneiro (2004), Vieira et al. (2005) e Zerbini et al. (2008).

O cultivo de plantas de maracujazeiro pode ser afetado por diversos sistemas *in vitro*, como a manutenção das plantas em frascos hermeticamente fechados nos quais a umidade interna é alta, limitando assim a transpiração. Quando as plantas são mantidas em frascos com pouca ou nenhuma troca gasosa, estas apresentam muitos estômatos não funcionais e menor deposição de cera epicuticular nas folhas (Zobayed et al. 2001). Entretanto, as plantas de maracujazeiro quando crescidas em ambiente de melhor troca gasosa apresentam maior resposta devido à sensibilidade das plantas ao etileno, que é um regulador de crescimento gasoso (Reis et al. 2001).

A organogênese *in vitro* é uma via de regeneração cuja célula e tecidos são induzidos a sofrer mudanças originando uma estrutura unipolar conhecida como primórdio caulinar (calogênese) ou de raiz (rizogênese), no qual o sistema vascular está freqüentemente conectado ao tecido parental (Thorpe, 1994).

Algumas etapas compõem o processo da organogênese, como a desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão (Christianson & Warnick, 1988). A competência organogênica é a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário na indução da formação do órgão, assim como o próprio metabolismo hormonal do explante, no qual determina o balanço hormonal endógeno para a indução da organogênese (Peres & Kerbauy, 1999).

A organogênese *in vitro* é o principal método de regeneração das Passifloráceas (Apezato-da-Glória et al., 2005; Vieira & Carneiro, 2004; Passos & Bernacci, 2005; Fernando et al., 2007; Zerbini et al., 2008; Alexandre et al., 2009), ocorrendo na forma direta (Dornelas & Vieira 1994; Apezato-da-Glória et al., 1999; Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004; Lombardi et al., 2007) quanto na indireta (Monteiro et al., 2000; Lombardi et al., 2007), dependendo do tipo de explante e do genótipo utilizado. Estudos relacionados à embriogênese somática para o gênero aos relatos de Otoni (1995), Anthony et al. (1999), Reis et al. (2007), Silva et al. (2009) e Paim Pinto (2009).

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*. Alguns autores relatam o cultivo *in vitro* de espécies de maracujá, utilizando como explantes segmentos nodais e internodais (Kantharajah & Dodd, 1990; Drew, 1991; Faria & Segura, 1997); gemas apicais (Scorza & Janick, 1980; Drew, 1991; Faria & Segura, 1997; Junghans et al. 2002), protoplastos (Dornelas, 1995; Otoni et al. 1996); primórdios de brotos (Kawata et al., 1995) discos foliares (Monteiro-Hara, 2000) e segmentos radiculares (Lombardi et al., 2007).

As respostas morfogênicas de plantas e tecidos cultivados *in vitro* são afetadas por diferentes componentes de meios de cultura, sendo importante avaliar seus efeitos sobre a regeneração das plantas. Diversas metodologias para inserção de genes de interesse em plantas mediadas por vetores de *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* requerem a utilização de antibióticos no meio de regeneração. Os explantes supostamente transformados têm que ser subcultivados várias vezes em meio suplementado com antibiótico a fim de controlar o crescimento bacteriano, sem interferir no potencial de regeneração das células (Costa et al., 2000, Mendes et al. 2008). De acordo com Cheng et al. (2004), o antibiótico ideal na suplementação do

meio de cultura para inibir *Agrobacterium* sp. deve ser altamente eficaz, de baixo custo sem interferir negativamente na regeneração dos explantes.

O surfactante não-iônico *Pluronic*[®] F-68 tem sido utilizado como copolímero polioxietileno-polioxipropileno ampliando a gama de compostos eficientes em estimular a regeneração *in vitro* em diversas espécies vegetais e em cultivo de células animais. Apesar dos seus benefícios, o *Pluronic*[®] F-68 tem o potencial de retardar o crescimento celular. Por exemplo, a *Pluronic*[®] F-68 apresenta uma ligeira toxicidade para algumas linhagens de células de mamíferos (Sowana et al., 2002). Segundo George et al. (2008), a combinação adequada de substâncias reguladoras, compostos orgânicos, fonte de carbono em concentrações ótimas adicionada ao meio de cultura, promovem a condição ideal para a organogênese *in vitro*.

Dado o potencial das espécies *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *Passiflora cincinnata* Mast. em condições *in vitro* este trabalho propõe:

- a) Estudar o efeito de diferentes vedações dos frascos na germinação de sementes a fim de obter plântulas com qualidade e vigor melhorando a resposta *in vitro*;
- b) estudar o efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BA) adicionada ao meio de cultura, na resposta organogênica de segmentos radiculares a partir de plântulas germinadas *in vitro*;
- c) monitorar anatomicamente o processo organogênico *in vitro* determinando a origem dos meristemóides e o processo de formação das brotações;
- d) avaliar os efeitos de diferentes antibióticos na regeneração de hipocótilos e raízes, utilizados como explantes, na transformação genética com *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*; e
- e) avaliar os efeitos da suplementação do surfactante não-iônico *Pluronic*[®] F-68 ao meio de cultura base, na indução de brotações *in vitro* em explantes hipocotiledonares.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.V. (Eds.) **Propagação *in vitro* do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Alegre: Editora EDUFES, pp. 119-176, 2009.
- ANTHONY, P.; OTONI, W.C.; POWER, J.B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: Hall, R.D. (ed.) **Plant Cell Culture Protocols**. Humana Press, Wageningen, p.169-181, 1999.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, pp. 387-407, 2005.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- BECERRA, D.C.; FERNANDO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition os donor affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.87-90, . 2004.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis in vitro as a development process. **HortScience**, v.23, p.515-519, 1988.
- CHENG, M.; LOWE, B.A.; SPENCER, T.M.; YE, X.; ARMSTRONG, C.L. Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 31–45, 2004.
- COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; CECON, P.R.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 327-332, 2000.
- DORNELAS, M. C. Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. Piracicaba. **Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 182 f. 1995.
- 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. A. In vitro culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 23-27, 1991.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v. 32, p. 1276-1277, 1997.

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

GEORGE, E.F.; HALL, M. A. DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture**. The background. 3rd Edition, 504 p. 2008.

IBGE – **Censo Agropecuário**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 24 ago. 2004. IBGE – **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 16 dez. 2006.

HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of Australian passionfruit 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.

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

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

MONTEIRO, A.C.B.A., NAKASAWA, 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.

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

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Planta**, v.42, p.63-74, 1966.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento. In: Ruggiero, C. (ed.) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, pp. 218-246, 1987.

OTONI, W.C. Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Viçosa. U.F.V. **Tese de Doutorado**. 198p. 1995.

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

PAIM PINTO, D.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; OTONI, W.C. Evaluation of genetic stability of somatic embryogenesis-derived plants of *Passiflora cincinnata* Mast. by means of flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2009.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F (eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p.361-383.

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

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)**. Viçosa, UFV. 90p. 2001.

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

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.

SILVA, M.L.; PAIM PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos in passionfruit (*Passiflora cincinnata* Masters). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2009.

SOWANA, D.D.; WILLIAMS, D.R.G.; O'NEILL, B.K.; DUNLOP, E.H. Studies of the shear protective effects of Pluronic F-68 on wild carrot cell cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p.165-173, 2002.

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

VAN DER PLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge Press, 1996. 224p

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz, R.E. (ed.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. CABI Publishing, Oxford, pp. 435-453, 2004.

VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; MATTA, F.P.; PÁDUA, J.G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.1-453, 2005.

ZERBINI, F.M.; OTONI, W.C.; VIEIRA, M.L.C. Passionfruit. In: Kole, C.R. & Hall, T. (eds.) **Compendium of Transgenic Crop Plants, Transgenic Series**, v.5, Tropical and Subtropical Fruit and Nuts, p. 212-233, 2008.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.37, p.807-813, 2001.

CAPÍTULO I:

EFEITO DO TIPO DE VEDAÇÃO DO FRASCO NA GERMINAÇÃO *in vitro* DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. cincinnata* Mast.)

1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de diferentes tipos de vedação do frasco no estabelecimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiros *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (população FB 100, FB 200 e FB 300) e *P. cincinnata*. Foram utilizados quatro tipos de vedações dos frascos: 1. filme plástico transparente de policloreto de vinila - PVC; 2. filme PVC com dois filtros MilliSeal[®] - PVCM; 3. embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano - ESP; e 4. placa de Petri com fita hipoalergênica (PPH). Para tal, as sementes tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa e posteriormente foram desinfestadas e inoculadas em meio MS $\frac{1}{2}$, suplementado com vitaminas B5, mio-inositol (0,1 g L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e 2,5 g L⁻¹ de Fitagel[®]. A germinação deu-se no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 27 \pm 2°C. As plantas permaneceram nessa condição por quinze dias adicionais. Os tratamentos que utilizaram a ESP e PVCM como material vedante, foram estatisticamente significativos (P>0,05) quanto à germinação, altura dos hipocótilos e comprimento das raízes, principalmente para *P. cincinnata* e 'FB 200'. Essas vedações favoreceram o crescimento *in vitro* de *P. cincinnata* e de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo recomendados no estabelecimento *in vitro* dessas espécies.

Palavras chaves: Maracujazeiro, germinação, cultivo *in vitro*, vedação.

2. INTRODUÇÃO

A germinação *in vitro* pode apresentar-se como estratégia interessante, pois além das características juvenis dos explantes, há chances de efetivo controle, seleção e descarte de material contaminado para finalidades diversas no cultivo *in vitro*. Sementes retiradas de frutos maduros de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Reis, 2001; Rego 2001; Couceiro, 2002; Alexandre, 2002; Dias et al., 2003; Reis, 2005; Carnevali, 2006) e *P. cincinnata* (Reis, 2005; Dias, 2006); submetidas à remoção completa do tegumento e germinadas *in vitro* proporcionam plântulas vigorosas, com tamanho e diâmetro suficientes para a obtenção, em média, de cinco segmentos hipocotiledonares. Visto que os segmentos hipocotiledonares são explantes que proporcionam melhores respostas organogênicas em *P. edulis* f. *flavicarpa*, a maneira mais prática e eficiente de consegui-los é a partir de plântulas axênicas, germinadas e crescidas *in vitro* (Alexandre et al., 2009).

O estabelecimento de material vegetal *in vitro* é uma etapa importante para os sistemas de transformação genética da espécie. Tendo em vista que a introdução de material *in vitro* de maracujazeiro se dá essencialmente através de sementes, há a necessidade de estudos que definam metodologias para a otimização da germinação e conseqüentemente o estabelecimento de protocolos de transformação genética para a espécie.

Hall et al. (2000) estudaram um protocolo de regeneração via organogênese de explantes cotiledonares do híbrido (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), os autores conseguiram melhorar a germinação escarificando as sementes, mas afirmaram que tecnicamente é difícil trabalhar com as sementes por serem pequenas e possuir tegumento duro. Isso demonstra a importância desses estudos, pois vários fatores podem levar ao insucesso do estabelecimento de plantas *in vitro* por meio de sementes.

As plantas obtidas mediante a propagação *in vitro* geralmente apresentam alterações significativas induzidas pelas condições *in vitro*, as quais podem diminuir a capacidade de sobrevivência após a transferência para condições ambientais *ex vitro*. A elevada umidade relativa, baixa irradiância e utilização de açúcares no meio de cultivo como fontes de carbono e energia, são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade

de órgãos e tecidos, de plântulas provenientes da propagação *in vitro* (Pospíšilová et al., 1999). Essas condições podem determinar a formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais, tornando a aclimatização crítica e limitante ao processo de propagação *in vitro*. Diversos estudos histológicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciadas se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Apóstolo et al., 2005; Louro et al., 2003). Além disso, o número e formato dos estômatos também são afetados, o que pode acarretar numa maior ou menor eficiência fotossintética da planta (Osório et al., 2005).

Porém, maiores incrementos na qualidade das plântulas de maracujazeiros germinadas *in vitro* sob diferentes sistemas de vedação é uma possibilidade ainda não relatada na literatura. Os diferentes sistemas de vedação utilizados para o maracujazeiro podem induzir respostas diferenciadas quanto ao número de sementes germinadas assim como no vigor destas. Dessa forma, o presente estudo investigou as diferentes respostas de germinação de sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *P. cincinnata* Mast. submetidas a quatro diferentes tipos de vedação dos frascos de cultivo *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Para a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. foram utilizadas sementes da população FB-100; FB-200 e FB-300 Maguary, cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda (Araguari, MG). Para a espécie *Passiflora cincinnata* Mast. foram utilizadas sementes maduras fornecidas pelo Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. A extração das sementes deu-se de acordo com o protocolo proposto por Tsuboi e Nakagawa (1992). Previamente ao processo de desinfestação das sementes, essas tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa, segundo técnica proposta por Reis (2001). Sob condições assépticas, a desinfestação consistiu da imersão inicial das sementes em álcool 70% (v/v) por 60s seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) (Super Globo[®], Brasil) mais Tween 20 a 0,1 % (v/v), por um período de 10 min. Após esse período, foram realizados quatro enxágües com água deionizada e autoclavada.

3.2 - Germinação das sementes in vitro

As sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 ml de capacidade), contendo 30 ml de meio de cultura e 12 sementes por frasco. A composição do meio de cultura consistiu de sais MS (Murashige & Skoog, 1962), à metade de sua concentração, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, USA), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120°C, 1,1 Pa por 20 min.

As sementes foram semeadas em frascos de vidro (250 ml de capacidade), contendo 30 ml de meio de cultura num total de 12 sementes por frasco, sendo que foi utilizado quatro tipos de vedações dos frascos: 1. filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear[®]); 2. filme

PVC com dois filtros MilliSeal[®] - PVCM; 3. embalagem sanfonada de polipropileno (SAAL Comércio & Embalagens) com filtro microbiano - ESP; e 4. placa de Petri com fita hipoalergênica (Micropore[®] 3M) - PPH.

A germinação deu-se no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. As plantas permaneceram nessa condição por quinze dias adicionais.

3.3 - Delineamento experimental

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 4, constituído de 4 populações como fonte de sementes de sementes de maracujazeiros (*P. cincinnata*, 'FB 100', 'FB 200' e 'FB 300') e 4 sistemas de vedação dos frascos de vidro (PVC, PVCM, PPH e ESP) sendo cada tratamento composto de 10 repetições com 12 sementes cada. No presente experimento foram avaliados os parâmetros número de sementes germinadas, altura dos hipocótilos e comprimento das plântulas, transcorrido o período de 30 dias. O experimento foi repetido por duas vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Efeito dos sistemas de vedação sobre a germinação

Os tratamentos de vedação diferiram significativamente entre os tratamentos e entre as populações (Quadro 1). Nota-se que o tratamento que utilizou a embalagem sanfonada de polipropileno como sistema de vedação apresentou, em média ($9,6 \pm 0,06$) de sementes germinadas por frasco, um número superior de percentagem de germinação para todos os genótipos, comparativamente com os outros sistemas de vedação.

Em comparação os outros tratamentos obtiveram resultados semelhantes para o genótipo FB 200 em que não se observou diferença significativa, constatando em média ($9,8 \pm 0,11$) uma alta germinação das sementes por frasco do referido genótipo. Nos frascos onde o tipo de vedação permitia melhor troca gasosa houve uma melhor resposta da germinação das sementes. Estes resultados proporcionam elevada taxa de germinação dos genótipos estudados, sendo que só com a mudança do tipo de vedação podemos obter maior número de sementes germinadas por frasco conseqüentemente mais explantes podem ser obtidos.

Nota-se que o tratamento em que se utilizou o filme plástico transparente de policloreto de vinila – PVC (Goodyear®) como material vedante apresentou em média resultados inferiores na germinação das sementes, com exceção para o genótipo FB 200.

Quadro 1: Valores médios de germinação (%) por frasco de quatro genótipos de maracujazeiros *Passiflora cincinnata* (PC), 'FB 100', 'FB 200' e 'FB 300 para os diferentes sistemas de vedação

	PC	'FB 100'	'FB 200'	'FB 300'
PPH	7,444 b B	9,222 a A	9,889 a A	9,000 a AB
ESP	9,556 a A	9,667 a A	9,667 a A	9,556 a A
PVCM	9,111 ab A	9,444 ab A	9,667 a A	8,667 b B
PVC	7,222 b B	8,000 b A	9,889 a A	7,778 b C

Médias seguidas por pelo menos uma letra maiúscula nas colunas e uma letra minúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ESP = embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano;
PPH = placa de Petri com fita hipoalergênica; **PVCM** = filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC com dois filtros MilliSeal®
PVC = filme plástico de PVC.

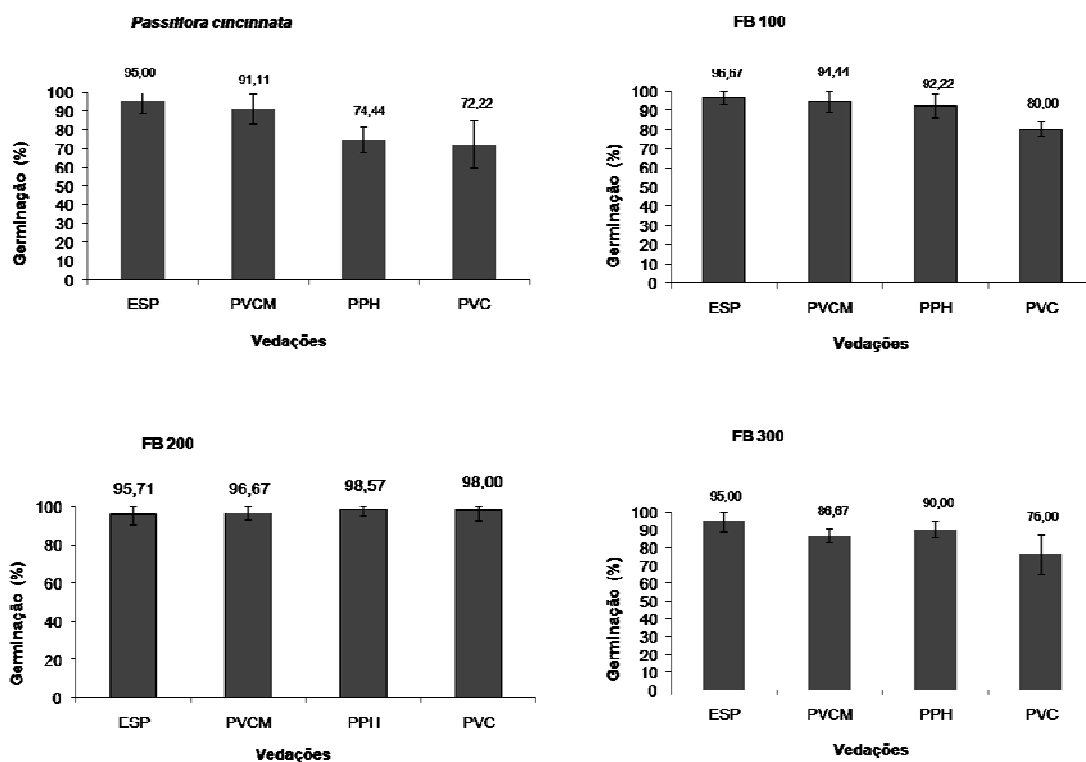


Figura 1: Médias das percentagens de germinação para os diferentes sistemas de vedação das espécies *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (FB 100, FB 200 e FB 300). **ESP** = embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano; **PPH** = placa de Petri com fita hipoalergênica, **PVCM** = filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC com dois filtros MilliSeal[®]; **PVC** = filme plástico de PVC. Barras = erros-padrão das médias.

A explicação provável para a perda do poder germinativo das sementes no tratamento no qual o filme plástico de PVC foi utilizado, comparado aos outros tratamentos, se deve ao fato que este tipo de material impossibilita uma eficiente troca gasosa com o ambiente, contribuindo para um aumento de temperatura no interior do frasco desidratando a semente. Provavelmente, também, não houve suprimento eficiente de O₂ para as sementes, prejudicando o processo germinativo uma vez que as células não promovem conversão efetiva de reservas em energia a ser utilizada pelo embrião para germinar.

Segundo Murphy et al. (1998) e Kozai & Nguyen, (2003) o aumento das trocas gasosas nos frascos reduz a umidade relativa podendo diminuir a concentração de etileno. De acordo com os mesmos autores alguns métodos, tais como perfurar a tampa e preencher o orifício com tampões, fazer aberturas laterais nos recipientes de cultura ou tampar os frascos com um filtro, podem

ser usados para aumentar as trocas gasosas, podendo ocorrer melhoria no desenvolvimento dos explantes.

Uma baixa concentração de CO₂ na atmosfera dos frascos de cultivo e elevados níveis de sacarose no meio causa baixa capacidade fotossintética das plantas, tanto *in vitro* como em condições *ex vitro* (Kozai & Kubota, 2001).

Ribeiro et al. (2009), avaliando tipos de vedações em *Solanum melongena* L. (tampa de prolipropileno, tampa de prolipropileno contendo duas membranas, e filme plástico esticável e transparente de policloreto de vinila-PVC), observaram que as plântulas mantidas nos frascos vedados com tampa rígida com membranas eram maiores e mais vigorosas, não houve diferença estatística no comprimento de raízes e eram mais desenvolvidas. Os mesmos autores estudaram a influência dos diferentes tipos de vedação na embriogênese em *Solanum melongena* L. testaram diferentes tipos de vedações: PVC, fita hipoalergênica Micropore[®] e Parafilme[®], verificaram que o tipo de vedação influenciou no peso da matéria fresca, sendo que as vedações PVC e Parafilme[®] foram estatisticamente superiores ao Micropore[®]. Mas observaram também que as placas vedadas com o Micropore[®] proporcionaram ramos maiores, mais esverdeados e mais vigorosos, enquanto que nos outros tipos de vedação houve maior calogênese nos explantes.

4.2 - Efeitos dos sistemas de vedação sobre a altura das plântulas

O parâmetro altura apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) para os diferentes genótipos e tratamentos referidos no presente estudo. A figura 2 mostra os diferentes tipos de vedações utilizadas no experimento, sendo que as respostas da germinação das sementes são desuniformes. A altura das plantas foi favorecida pelo tipo de vedação com embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano, proporcionando maior número de explantes utilizados nos experimentos posteriores.

A vedação por meio de membrana foi o tratamento mais efetivo para promover maior crescimento dos genótipos avaliados. Por outro lado, o tratamento em que se utilizou o filme plástico de PVC, à exceção para *P. cincinnata*, apresentou resultados quanto à altura média, inferior ao dos outros tratamentos.

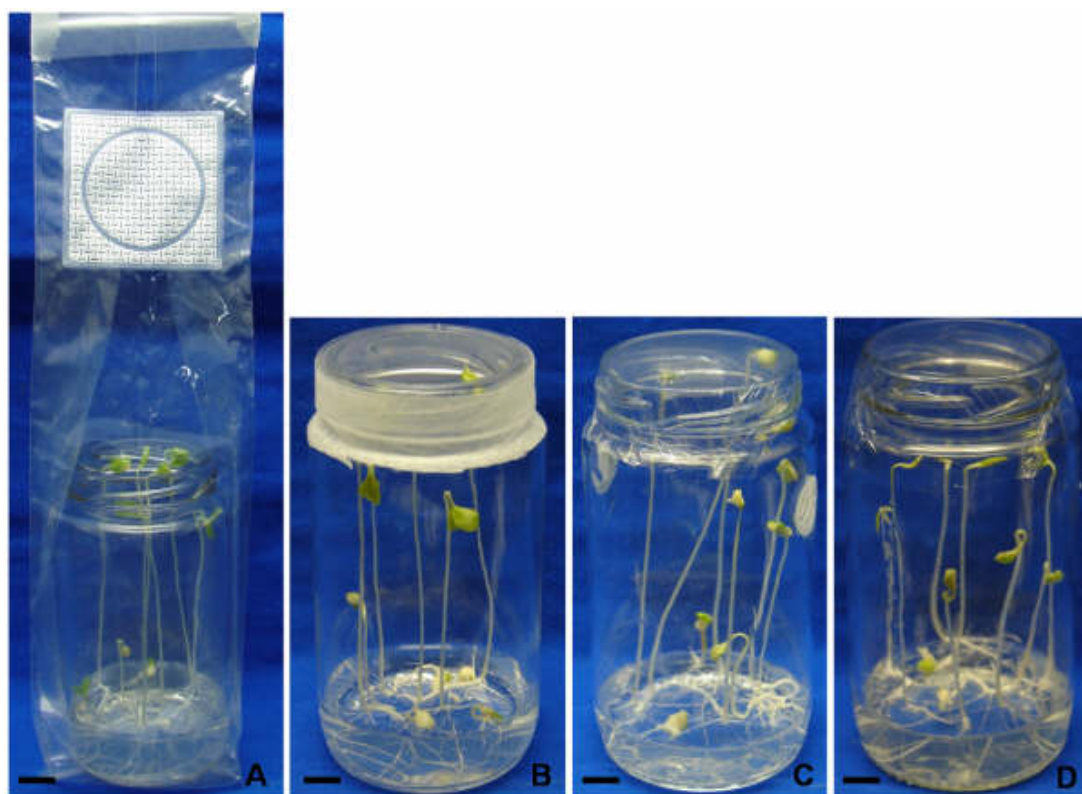


Figura 2: Influência de diferentes tipos de vedação na germinação de sementes de maracujá *in vitro*, aos 15 dias de cultivo *in vitro* **A.** embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano, **B.** placa de Petri com fita hipoalergênica (Micropore[®] 3M), **C.** filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear[®]) com dois filtros MilliSeal[®] **D.** filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear[®]).

Os genótipos ‘FB 300’ e FB 100 apresentaram altura média superior das plântulas para todos os tratamentos, exceto para o tratamento com filme plástico de PVC.

A razão para esta diferença possivelmente, conforme comentado anteriormente, é em função da maior troca gasosa ocorrida nos tratamentos com membrana que resultou em maior crescimento das plântulas.

O tratamento envolvendo a embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano não apresentou os mesmos resultados para a altura como para a germinação, e a explicação plausível consiste em que as plântulas neste tratamento desenvolveram folhas maiores e hipocótilos de maiores diâmetros, em contrapartida resultando em um crescimento menor. Observou-se também que o meio de cultura exauriu-se em grande parte dos frascos que continham as plântulas após os 30 dias, quando ocorreu a avaliação revelando que o crescimento em altura pode ter sido prejudicado por este fato.

Quadro 2: Valores médios em centímetro da altura de plântulas das espécies *Passiflora cincinnata* (PC) e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (FB 100, FB 200 e FB 300) para os diferentes tipos de vedação.

	PC	'FB 100'	'FB 200'	'FB 300'
ESP	13,215 a A	12,031 a AB	10,769 b C	11,021 a BC
PPH	14,475 a A	12,112 a A	10,286 bB	9,871 a B
PVCM	12,866 a A	12,502 a A	12,347 a A	10,766 a B
PVC	11,870 a A	9,172 b B	8,885 c B	7,869 b B

Médias seguidas por pelo menos uma letra maiúscula nas linhas e uma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ESP = embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano, **PPH** = placa de Petri com fita hipoalergênica; **PVCM** = filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC com dois filtros MilliSeal® ; **PVC** = filme plástico de PVC.

4.2 - Efeitos dos tipos de vedação sobre o comprimento das raízes das plântulas

Passiflora cincinnata apresentou diferença significativa para comprimento médio das raízes, em comparação com os outros genótipos como demonstra os Quadro 3 e 4. Não houve interação significativa entre genótipo e tratamento, demonstrando dessa forma um comportamento diferenciado dos genótipos avaliados quanto aos tratamentos testados.

Quadro 3: Valores médios de comprimento de raízes em centímetro de plântulas para os diferentes sistemas de vedação em quatro diferentes genótipos de maracujazeiros.

Genótipo	Valores médios de comprimento (cm)
<i>Passiflora cincinnata</i>	11,1179 a
FB 100	8,1373 b
FB 200	8,1132 b
FB 300	7,1406 b

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 4: Valores médios de comprimento de raízes de plântulas para os diferentes sistemas de vedação em quatro diferentes genótipos de maracujazeiros.

Tratamentos	Valores médios de comprimento (cm)
ESP	9,2986 a
PPH	8,8985 a
PVCM	8,7556 a
PVC	7,5563 b

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ESP = embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano; **PPH** = placa de Petri com fita hipoalergênica; **PVCM** = filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC com dois filtros MilliSeal®; **PVC** = filme plástico de PVC.

Para os quatro diferentes tratamentos verificou-se que o com filme plástico de PVC resultou em menor comprimento médio das raízes, diferindo significativamente dos outros três sistemas de vedação. Nos sistemas de vedação que permitiam melhor troca gasosa com o meio houve maior comprimento das raízes, pode ser inferido que maior número de explantes pode ser obtido em experimentos posteriores. Com relação à variável comprimento de raiz, Damiani & Schuch (2008) observaram que esta varia em função do tipo de vedação dos frascos, os autores verificaram aumento do comprimento da raiz em frascos vedados com algodão e cultivados durante o verão. O efeito positivo da vedação com algodão no comprimento das raízes foi aumentado com o cultivo em meio livre de sacarose.

Santana et al. (2008) observaram que a presença de sacarose no meio de cultura estimulou o crescimento das raízes adventícias e que o tipo de vedação foi o fator que mais influenciou no crescimento das raízes. No meio com sacarose observaram que as raízes cresceram 30,35 mm enquanto que no meio sem sacarose o crescimento foi de 18,15 mm. Com a vedação dos tubos de cultivo com tampa e PVC, as raízes apresentaram o menor comprimento médio 9,02 mm, e com o tampão de algodão ou tampa sem PVC, o comprimento médio da maior raiz foi de 31,75 e 31,95 mm, representando um acréscimo de 250% no crescimento radicular.

Para auxiliar o crescimento das plantas durante a micropropagação fotoautotrófica, é necessário aumentar a concentração de CO₂ e reduzir a umidade relativa e a concentração de etileno nos frascos de cultivo (Kozai & Kubota, 2001; Arigita et al., 2002). Uma prática que vem sendo testada para favorecer as trocas gasosas é o uso de diferentes sistemas de vedação dos frascos, utilizando materiais mais porosos, tais como algodão ou filtros permeáveis a gases (Kozai & Nguyen, 2003).

Segundo Gonçalves et al. (2008), um ambiente no qual as trocas gasosas modificam as concentrações de CO₂ e O₂, evitando assim o acúmulo de etileno. O etileno é um regulador de crescimento encontrado na forma gasosa, que se acumula facilmente nos frascos de cultura juntamente com outros compostos voláteis. Essa quantidade acumulada depende, primeiramente, da taxa de produção exibida pelos tecidos cultivados e do nível de trocas gasosas permitida pelos recipientes de cultura (Reis et al., 2003).

Com o aumento das trocas gasosas no recipiente de cultivo, a concentração de etileno também é reduzida. O acúmulo de etileno tem um efeito adverso no desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação, o desenvolvimento, a morfologia e o crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar, o comprimento dos brotos (Jackson et al., 1991), inibindo a regeneração de novos brotos (Biddington, 1992) e causando necrose apical nas plantas.

O etileno influencia a resposta morfogênica de diversas espécies, dentre as quais se destacam: *Carica papaya* (Magdalita et al., 1997), *Bixa orellana* (Paiva-Neto et al., 2009), *Prunus persica* x *P. amygdalus* (Dimasi-Theriou & Economou, 1995), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Reis et al., 2003), (Dias, 2006), *P. cinicinnata* Mast., *Phaseolus vulgaris* (Carvalho et al., 2000), dentre outras. Além do ambiente gasoso, o meio de cultivo pode afetar as respostas de regeneração dos explantes devido a concentrações de nutrientes, reguladores de crescimento, agentes gelificantes entre outros, que possibilitam uma resposta adequada, no desenvolvimento *in vitro* de *Passiflora cinicinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* na indução de organogênese.

O presente estudo demonstrou que a utilização de plástico e membrana como sistema de vedação mais viável para a obtenção de plântulas de maracujazeiros *in vitro*. Esses dois materiais vedantes favoreceram o crescimento de hipocótilos e raízes *in vitro* dos genótipos estudados,

particularmente para *P. cincinnata* e FB 200, quanto aos parâmetros analisados.

O tipo de vedação influenciou a resposta morfogênica, sugerindo que a maior troca gasosa pode ter efeitos positivos, como é o caso da indução de organogênese e alongamento de ápices caulinares. Ressaltando a importância da necessidade de se avaliar, para cada espécie-alvo de pesquisa, a influência do tipo de vedação em suas respostas morfogênicas.

Sugere-se para futuros trabalhos de propagação *in vitro* de maracujazeiro, mediados pela organogênese, uma utilização mais ampla de filtros que permitam maiores trocas gasosa, pois além de melhorar na resposta obtida, também influencia positivamente na sobrevivência das plantas na fase de aclimatização. As plantas obtidas neste presente trabalho foram utilizadas nos experimentos posteriores e vedadas com embalagens sanfonadas de polipropileno com filtro microbiano, possibilitando maior número de explantes por planta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.V. (Eds.) **Propagação *in vitro* do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Alegre: Editora EDUFES, p. 119-176, 2009.

APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v. 41, p. 307-313, 2005.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.166-173, 2002.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v.11, p.173-187, 1992.

CARVALHO, M.H.C.; LE, B.V.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, A.T.P.; VAN, K.T.T. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. **Plant Science**, v.159, p. 223-232, 2000.

COUCEIRO, M.A. Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, UFV. 95 p., 2002.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. *In vitro* rooting of blueberry under photoautotrophic conditions. **Ciência Rural**, v.39, p. 1012-1017, 2008.

DIAS, L.L.C. Influência do etileno e poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* de maracujá (*Passiflora* sp.). **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, UFV, 83 p., 2006

DIAS, J.M.M.; COUCEIRO, M.A.; VENTURA, G.M.; SIQUEIRA, D.L.; LIMA, J.C. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes do maracujazeiro. **Revista Ceres**, v.50, p.549-564, 2003.

DIMASI-THERIOU, K., ECONOMOU, A.S., SFAKIOTAKIS, E.M. Promotion of petunia (*Petunia hybrida* L.) regeneration *in vitro* by ethylene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.219-225, 1993.

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

GONÇALVES, L. A.; GERALDINE, R. M.; PICOLI, E. A. T.; VENDRAME, W. A. CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.92, p.243–250, 2008.

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

JACKSON, M.B.; ABBOTT, A. J.; BELCHER, A. R.; HALL, K. C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. **Annals of Botany**, v.67, p.229-237, 1991.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M. & ISHII, K. (eds.) **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 757-781.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v.114, p.525-537, 2001.

LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. **Trees**, v. 17, p. 11-22, 2003.

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

MURPHY, K.P.; SANTAMARIA, J.M.; DAVIES, W.J.; LUMSDEN, P.J. Ventilation of culture vessels: I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 73, p. 725-729, 1998.

PAIVA NETO, V.B.; REIS, L.B.; FINGER, F.L.; BARROS, R.S.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 2009.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)**. Viçosa, UFV, 90 p., 2001.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters). **Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)**. Viçosa, UFV, 105 p., 2005.

RIBEIRO, A. P. O.; PICOLI, E. A. T.; LANI, E. R. G.; VENDRAME, W. A.; OTONI, W. C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.45, p. 421-428, 2009.

OSÓRIO, M. L.; GONÇALVES, S.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Effects of CO₂ concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 161-167, 2005.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.

SAEG (Sistema para Análises Estatísticas), Versão 9.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2007.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. Stimulus of the photoautotrophic behavior during the *in vitro* rooting of *Annona glabra* L., I. Development of root system and shoot. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 80-86, 2008.

TSUBOI, H., NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Científica**, v. 20, p. 63-72, 1992.

CAPÍTULO II

Explantos radiculares: uma fonte alternativa de organogênese in vitro para maracujazeiros

1. RESUMO

O objetivo do trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de um protocolo para a regeneração de brotações de maracujazeiro a partir de explantes radiculares por organogênese direta. Os explantes foram colocados em MS suplementado com 4,44 μM de 6-benzilaminopurina (BA) para obtenção da organogênese, as brotações foram transferidas para o meio líquido suplementado com 1 mg L^{-1} de GA_3 e, posteriormente, aclimatizadas em substrato fibra de coco e levadas para casa de vegetação em mistura de fibra de coco e Plantmax[®] (1:1). Durante o processo organogênico foram coletadas amostras dos explantes para análise sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Nos explantes radiculares utilizados em *P. cincinnata* houve resposta mais rápida em relação a *P. edulis* f. *flavicarpa*. Entretanto, aos 90 dias, quando foi realizada a terceira avaliação, o genótipo FB 200 apresentou número de brotações estatisticamente superior aos genótipos FB 100 e FB 300, não diferindo de *P. cincinnata*. A organogênese em *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* ocorreu pela via direta, confirmada por estudos anatômicos e pela microscopia eletrônica de varredura, mostrando a diferenciação de brotações surgindo das células do câmbio vascular com intensa divisão celular das células periclinais com típica conexão vascular com os explantes radiculares. As respostas dos genótipos estudados ocorrem em épocas diferente sendo um processo assíncrono no qual a suplementação do regulador de crescimento BA ao meio de cultivo é indispensável para a resposta organogênica de explantes radiculares. Brotações alongadas em meio líquido sob agitação foram enraizadas em substrato fibra de coco, e aclimatizadas com sucesso. A citometria de fluxo indicou que não houve variação na quantidade de DNA dos regenerantes aclimatizados de todos os genótipos. A quantidade de DNA (pg) nos regenerantes de *P. cincinnata* (2,99 pg) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (3,26-3,28 pg) foram compatíveis com as quantidades de DNA das plantas controle, obtidas por via seminífera. O

protocolo apresentado poderá ser útil como alternativa de explantes a serem usados na transformação genética de maracujazeiros mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Palavras-chaves: Citometria de fluxo; organogênese direta; *Passiflora*.

2. INTRODUÇÃO

Passiflora edulis Sims f. *flavicarpa* Deg. é uma espécie de maracujazeiro de grande importância econômica no Brasil em razão dos inúmeros produtos alimentícios obtidos dos frutos, como sucos e geléias. Acrescentam-se as propriedades farmacológicas da espécie de relevante interesse para as indústrias do setor. O Brasil possui uma condição privilegiada no que diz respeito a recursos genéticos de *Passiflora*, já que o maior centro de dispersão está localizado no centro norte do país (Souza & Meletti, 1997). *Passiflora cincinnata* Masters, ainda que não cultivada comercialmente, possuem flores vistosas, grandes e perfumadas com características etnomedicinais, tem sua importância no melhoramento genético do gênero, por apresentarem plantas rústicas e vigorosas, tolerantes a nematóides (*Meloidogyne* sp.) e à bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) (Meletti et al., 2005; Oliveira & Ruggiero, 2005).

O maracujazeiro é uma cultura bem estudada em seu cultivo *in vitro*, não se mostrando recalcitrante e respondendo bem à aplicação de reguladores de crescimento, já tendo sido possível fechar o ciclo de micropropagação (Grattapaglia et al., 1991). De maneira geral, a cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora* compreende a conservação de recursos genéticos e a obtenção de plantas transgênicas (Vieira & Carneiro, 2004; Passos & Bernacci, 2005; Zerbini et al., 2008; Alexandre et al., 2009). Entretanto, ressalte-se que o potencial propagativo depende da espécie ou da fonte de explante (Apezato-da-Glória et al., 1999). Para o gênero, há relatos da organogênese direta que pode ser mediada por diversos explantes não meristemáticos, como segmentos de folhas (Becerra et al., 2004); cotilédones e hipocótilos (Dornelas & Vieira, 1994; Hall et al. 2000; Reis, 2001; Fernando et al. 2005), gavinhas (Dornelas & Vieira, 1994), internódios (Biasi et al., 2000) e raízes (Lombardi et al., 2007).

O uso de raízes como explantes é relatado com sucesso na regeneração de plantas como *Linum usitatissimum* (Xiang-Can et al., 1989), *Aeschynomene sensitive* (Nef-Campa et al., 1996), *Lycopersicon* sp. (Peres et al., 2001), *Solanum melongena* (Franklin et al., 2004), *Diospyros kaki* (Tetsumura & Yukinaga, 1996; Carvalho & Biasi, 2004), *Elentherococcus koreanum* (Park et al., 2005), *Cleome rosaea* (Simões et al., 2009), dentre outras. Em maracujazeiro, a regeneração de plantas de *Passiflora cincinnata* Mast. foi

proposta e caracterizada via organogêneses direta e indireta, a partir de segmentos radiculares (Lombardi et al., 2007). Para *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, Reis et al. (2007) obtiveram regeneração espontânea a partir de raízes transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*. No entanto, a avaliação do potencial morfogênico de explantes radiculares, à semelhança do proposto por Lombardi et al. (2007), ainda não foi relatada. Essa fonte de explantes pode representar fonte adicional e potencial para trabalhos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A organogênese é a principal via de regeneração de *Passiflora* podendo ser direta (Dornelas & Vieira, 1994; Apezato-da-Glória et al. 1999, Hall et al. 2000; Becerra et al., 2004) ou indireta (Monteiro et al., 2000, Lombardi et al., 2007), dependendo da fonte de explante e do genótipo usado. A regeneração de gemas adventícias em explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* é muito freqüente (Apezato-da-Glória et al., 2005), entretanto, tem sido erroneamente interpretada na literatura como gemas adventícias que não alongam (Fernando et al., 2005).

Dado o potencial das espécies de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. e *P. cincinnata* Mast. para estudos de melhoramento genético e a falta de informações na literatura sobre a capacidade de formação de gemas adventícias em condições *in vitro* em *P. edulis* f. *flavicarpa*, esse trabalho teve como objetivo estudar o efeito de 6-benzilaminopurina (BA), adicionada ao meio de cultura, na resposta organogênica de segmentos radiculares e caracterizar anatomicamente a via de regeneração *in vitro* dos explantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal

Para este estudo utilizou-se explantes radiculares de plantas de *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. germinadas *in vitro*.

Para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* foram utilizadas sementes da população FB-100; FB-200 e FB-300 Maguary, cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG). Para *P. cincinnata* foram utilizadas sementes maduras colhidas em pomar de polinização aberta, do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa.

A extração das sementes deu-se de acordo com o protocolo proposto por Tsuboi & Nakagawa (1992). Previamente à desinfestação das sementes, essas tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa, segundo Reis (2001). Sob condições assépticas, a desinfestação consistiu da imersão inicial das sementes em álcool 70% (v/v) por 60 s, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5% (v/v) (Super Globo[®], Brasil) mais Tween 20 a 0,1 % (v/v), por um período de 10 min. Após esse período, foram realizados quatro enxágües com água deionizada e autoclavada.

As sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 ml de capacidade), contendo 30 ml de meio de cultura e 12 sementes por frasco. A composição do meio de cultura consistiu de sais MS (Murashige e Skoog, 1962) à metade de sua concentração, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, USA), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120°C, 1,1 Pa por 20 min.

As sementes foram germinadas em frascos vedados com embalagem sanfonada de polipropileno (SAAL Comércio & Embalagens) com filtro microbiano, e a germinação deu-se no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, aonde permaneceram por mais quinze dias.

3.2 - Organogênese in vitro

Sob condições assépticas, raízes de plântulas com 30 dias foram excisadas e inoculadas em meio de cultura, consistido de sais MS, complexo vitamínico B5, 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, USA), acrescido de $2,35 \mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BA), sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Após autoclavado a 120°C , $1,1 \text{ Pa}$ por 20 min, verteu-se 25 ml de meio em cada placa de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 X 15 mm, J. Prolab, Brasil). Sendo vedados com filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila – PVC (Goodyear[®]).

3.3 - Alongamento e enraizamento dos ramos

Os explantes permaneceram em meio de obtenção da organogênese *in vitro* por um período de 20 dias, sendo posteriormente transferidas para o meio líquido com a mesma formulação, diferindo quanto ao regulador de crescimento, que neste caso, foi suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3). Após 25 dias as plântulas apresentaram-se com 2 a 3 pares de folhas, sendo transferidas para tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo o substrato de fibra de coco para enraizamento das plântulas. Após 15 dias, as plântulas enraizadas foram aclimatizadas. Nessa fase, as plantas foram transferidas a potes plásticos contendo substrato na mistura 1:1 fibra de coco e Plantmax[®] (Eucatex, São Paulo) envoltas por sacos plásticos (12 x 25 cm) durante 20 dias e, posteriormente, levadas para casa de vegetação.

3.4 - Avaliação do experimento

A avaliação do experimento se deu aos 30, 60 e 90 dias devido à diferença entre as respostas dos genótipos estudados, quando cultivados em meio MS suplementado com o regulador de crescimento $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA. Após a indução da organogênese em meio MS semi-sólido suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA, os explantes contendo as brotações foram transferidos para o meio líquido MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 , para alongamento das brotações em Erlenmeyer com 30 mL de meio em mesa agitadora orbital a 100 rpm. Os explantes permaneceram durante 15 dias nestas condições, sendo

posteriormente transferidos para enraizamento. As brotações a partir de explantes radiculares das duas espécies *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* quando estavam alongadas após 15 dias em meio líquido foram transferidas para tubo de ensaio contendo substrato fibra de coco e Plantmax[®] na proporção 1:1 para enraizamento das brotações.

3.5 - Estudo anatômico e caracterização ultraestrutural da organogênese in vitro

Explantes radiculares com gemas e brotos caracteristicamente organogênicos foram coletados e fixados em Karnovsky (1965) por 16 horas. Posteriormente, foram desidratados em série etílica crescente, incluídos em resina metacrilato (Historesin, Leica[®]). Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), e os cortes longitudinais de 8 µm de espessura foram aderidos em lâminas histológicas, e corados com Azul de Toluidina (O'Brien & McCully, 1981), com pH 7,0, por 10 minutos. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina sintética Permunt. O registro fotográfico foi realizado em fotomicroscópio Olympus Ax70 com sistema U-Photo localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

Para a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura, amostras de raízes organogênicas foram fixados por 16 horas de acordo com Karnovsky (1965), foram desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico de CO₂ em equipamento Balzers (modelo CPD-020, Balzers). Depois de fixadas em *stubs*, as amostras foram metalizadas em equipamento Balzers (modelo FDU-010) acoplado ao conjunto de pulverização catódica (modelo SCA-010). As observações das amostras bem como os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1430VP), do Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa.

3.6 - Avaliação da quantidade de DNA por citometria de fluxo

Aproximadamente 20-30 mg de folhas frescas de cada planta foram cortadas em pequenos fragmentos com uma navalha de aço descartável na presença de 1 mL de tampão LB01 para liberação dos núcleos (Doležel e Bartos, 2005). Como padrão de referência interna foi utilizado *Glycine max*

'Polanka', com conteúdo 2C de DNA de 2,50 pg (Doležel et al., 2005, 2007). Os tecidos previamente macerados foram aspirados através de duas camadas de tela metálica com uma pipeta plástica, filtrados por uma membrana de nylon de 50 µm e coletados em um tubo de poliestireno.

A suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1 mg/mL, Sigma Chemical Company, USA), sendo adicionados 5 µL de RNase (Amresco, USA) para cada amostra. As amostras foram armazenadas a 4°C no escuro e analisadas após 1-2 horas.

Para cada amostra, no mínimo 10.000 núcleos foram analisados usando um visor de escala logarítmica. As análises foram realizadas com utilização de um citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Cada histograma citométrico foi documentado usando o software Cell Quest e analisado com o software livre WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Amostra (2C DNA)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 de } G. \text{ max}} \times 2,50 \text{ pg (conteúdo de DNA de } G. \text{ max)}$$

3.7 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo SAEG (2007) em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada parcela uma placa de Petri contendo 12 explantes. Foi realizada a contagem do número de brotações e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aparecimento de gemas organogênicas foi observado aos 20 dias de cultivo com formação de brotos aos 30 dias de cultivo (Figura 1). Nas duas espécies estudadas *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. verificou-se organogênese direta confirmada através de cortes histológicos. O número de brotações foi significativo estatisticamente, sendo que o maior número de brotações foi observado em *P. cincinnata* com média de 24,40 brotações aos 30 dias de cultivo, atingindo a média de 42,40 brotações aos 90 dias de cultivo, em meio MS com 4,44 μM de BA (Tabela 1).

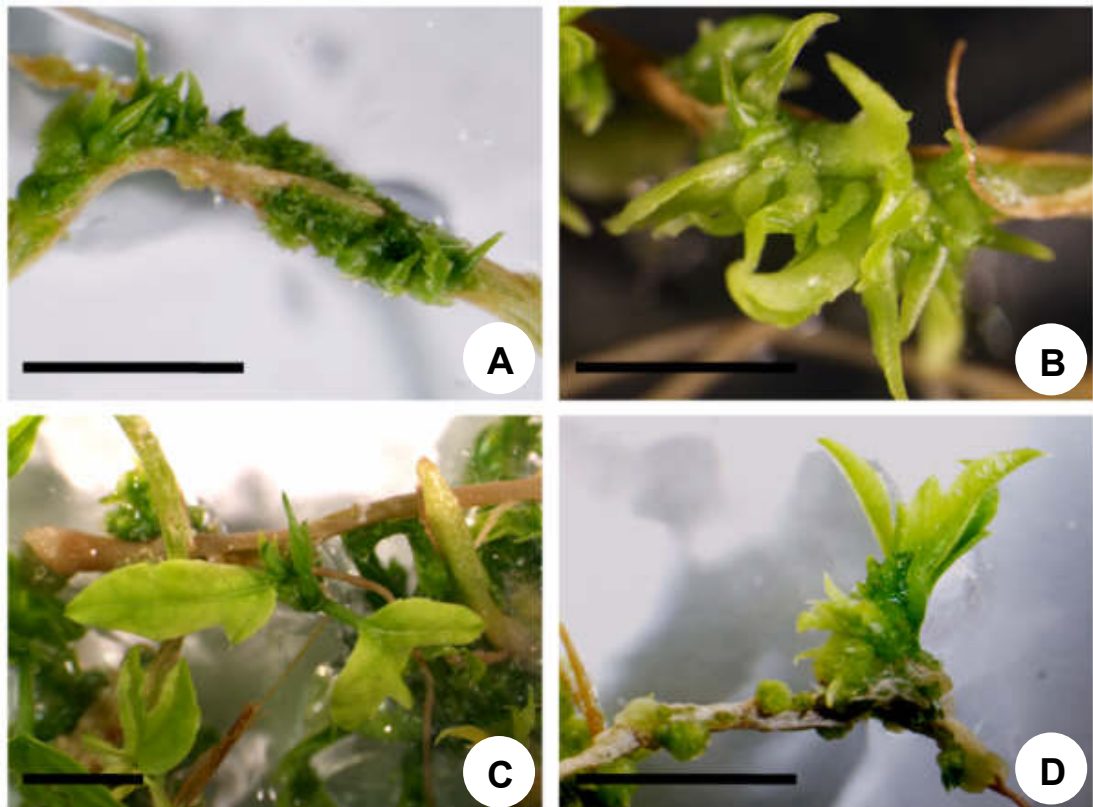


Figura 1: Organogênese direta em explantes radiculares na fase de indução aos 30 dias de cultivo em meio MS semi-sólido suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA de: **A, B.** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* FB 100; **C, D.** *P. cincinnata*. Barras: 0,5 cm.

Tabela 1: Número médio de brotações em *Passiflora cincinnata* Mast. (PC) e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. ('FB 100', 'FB 200' e 'FB 300') em três períodos de avaliação.

Genótipo	Períodos de avaliação (dias)		
	30	60	90
PC	24,40 Ba	24,00 Bab	42,40 Aa
FB 100	9,80 Ab	14,00 Ab	16,40 Ab
FB 200	8,20 Cb	18,90 Bab	42,40 Aa
FB 300	7,30 Bb	17,30 Aab	20,70 Ab

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula, nas linhas, e uma letra maiúscula, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Lombardi et al. (2007), estudando explantes radiculares de *P. cincinnata* relataram que não houve diferença estatística no número de gemas diferenciadas em relação a diferentes concentrações de BA; contudo, houve melhor resposta na concentração de 2,22 μM de BA, com 60% dos explantes apresentando formação de gemas aos 28 dias de cultivo, com organogêneses direta e indireta. Enquanto que neste trabalho aos 30 dias de cultivo houve uma percentagem média de 50%, porém com brotações formadas por organogênese direta. Os resultados obtidos no presente trabalho foi em meio MS suplementado com 4,44 μM BA, conforme ensaio preliminares com diferentes concentrações de BA (dados não mostrados) observou-se melhor resposta das espécies a essa concentração.

Em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'FB100', 'FB 200' e 'FB 300' a resposta organogênica foi mais assincrônica, apresentando média de brotações de 9,8 para 'FB 100' 8,2 para 'FB 200' e 7,3 para 'FB 300' aos 30 dias de cultivo, com brotações formadas por organogênese direta. Aos 90 dias de cultivo, os genótipos apresentaram médias de brotações de 16,4 para 'FB 100', 42,4 para 'FB 200', e 20,7 para 'FB 300'. O genótipo 'FB 200' apresentou aumento em cinco vezes no número médio de brotações, sendo estatisticamente superior a 'FB 100' e 'FB 300', e não diferindo de *P. cincinnata* (Tabela 1).

Em segmentos radiculares de *Tylophora indica*, a melhor resposta obtida via organogênese com indução de brotos foi cerca de 42% dos explantes em meio MS suplementado com 10,72 μM de BA (Chaudhuri et al., 2004). Enquanto que para as espécies *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* a adição de 4,44 μM de BA foi suficiente para proporcionar organogênese direta.

Fernando et al. (2007), estudando *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., obteve organogênese direta em discos foliares e indireta em explantes hipocotiledonares, enquanto que em explantes foliares somente a via organogênica direta ocorreu em meio MS suplementado com 4,44 µM de BA e 5% de água de coco. No presente trabalho ocorreu organogênese direta em explantes radiculares de *P. edulis* f. *flavicarpa* em meio MS suplementado somente com 4,44 µM de BA.

Simões et al. (2009), estudando raízes de *Cleome rósea* Vahl cultivados em meio MS líquido, observaram que os ramos adventícios produzidos nas raízes ficavam hiperidricos. Entretanto quando as raízes foram cultivadas em meio semi-sólido suplementados com 2,22 µM de BA observaram uma média de 5,8 ±0,8 ramos por explante por organogênese indireta. Em ensaios preliminares no presente trabalho o mesmo foi observado, as raízes das espécies *P. cincinnata* e *P. edulis* apresentaram brotos em meio semi-sólido suplementado com 4,44 µM de BA. Em meio líquido, a indução de brotações em raízes de *P. cincinnata* e *P. edulis* não ocorria e, quando surgiam brotações, estas eram hiperidricas, apresentando oxidação das raízes.

Estudos ao microscópio eletrônico de varredura evidenciaram que em *Passiflora cincinnata* formaram-se meristemóides aos 15 dias de cultivo; e aos 20 dias os explantes radiculares já apresentaram brotações diferenciadas (Figura 2 A-B). Em *P. edulis* f. *flavicarpa*, os genótipos FB 100, FB 200, FB 300 apresentaram gemas aos 20 dias de cultivo e brotações semelhantes aos 30 dias, apresentando organogênese direta (Figura 2 C-H).

Na literatura há relatos da presença de calos em explantes foliares de *P. edulis* (Kantharajah & Dodd, 1990; Otahola, 2000, Monteiro et al., 2000). Fernando et al. (2007), estudando explantes derivados de hipocótilos e folhas da espécie *P. edulis* obtiveram organogênese direta em meio MS suplementado com 4,44 µM de BA e 5% de água de coco. Otahola (2000) observou presença de calos em explantes foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, porém não ocorreu a formação de gemas a partir desse calo. Monteiro et al. (2000) estudando a regeneração *in vitro* de plantas de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares, verificaram formação de calos nas bordas dos discos foliares cultivados em meio MS suplementado com 2,22 µM e 4,44 µM de BA, relatando que estes calos tinham aspecto organogênico.

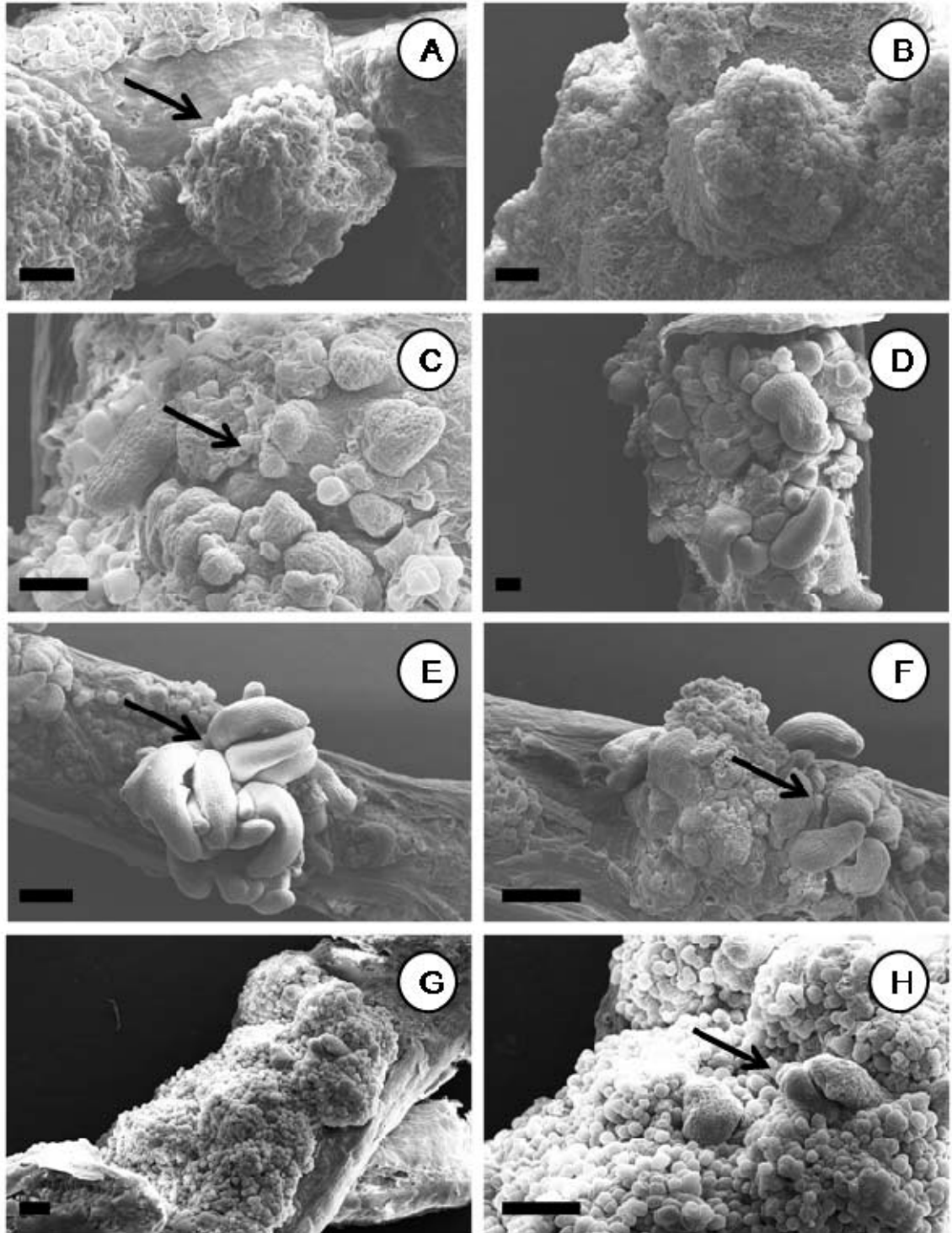


Figura 2: Explantes radiculares inoculados em meio MS suplemento com 4,44 μM de BA. **A,B.** Protuberâncias (setas) formadas diretamente no explante *Passiflora cincinnata* aos 15 dias de cultivo *in vitro*. **C-H.** *Passiflora edulis* genótipos FB 100 e FB 300 aos 20 e 30 dias de cultivo *in vitro* com gemas e primórdios foliares (setas, figuras **E-F**) formadas diretamente dos explantes radiculares. Barras: A,C,D = 100 μm ; B,E,F,G,H = 200 μm .

A organogênese direta das espécies *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* ocorreu na presença de 4,44 μM de BA, sendo esta citocinina indispensável para regeneração *in vitro* independente do explante estudado, a resposta ocorre de forma diferente dependendo do genótipo e espécie estudada. Pode-se observar que a organogênese direta em *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* ocorreu através das divisões periclinais onde as brotações surgiram através do rompimento da endoderme, mantendo conexão vascular com o explante. Como observado através dos cortes longitudinais, o processo é assíncrono com pontos de origem das futuras gemas e brotações (Figura 3). No processo organogênico a falta de sincronia também foi relatado por outros autores em *Passiflora* (Dornelas & Vieira, 1994; Appezzato-da-Glória et al., 1999; Biasi et al., 2000; Monteiro et al. 2000, Lombardi et al., 2007).

Lombardi et al. (2007) observaram nos cortes anatômicos que na organogênese direta de *P. cincinnata* ocorre rompimento da endoderme, pelo periciclo em divisão e a gema caulinar surgindo endogenamente apresentando conexão com a região vascular da raiz. Na organogênese indireta os autores observaram que o calo formava-se nas extremidades das raízes e as gemas foram observadas na superfície do calo, sem conexão vascular.

Estudos anatômicos em explantes radiculares de *Curcuma zedoaria*, confirmaram a organogênese indireta onde as divisões celulares ocorrem a partir do parênquima cortical formando calos (Melo et al., 2001). O mesmo ocorreu em explantes radiculares de tomateiros silvestres cultivados *in vitro*, nos qual obtiveram organogênese direta e indireta a partir de células do parênquima cortical (Peres et al., 2001). Resultados diferentes quanto à origem da organogênese em *Passiflora* aos relatados nesse trabalho e por Lombardi et al. (2007).

As brotações obtidas nos explantes radiculares de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, quando cultivadas em meio MS líquido suplementado com 1,0 mg L^{-1} de GA_3 , alongaram aos 10 dias de cultivo cerca de 2 cm e aos 20 dias de cultivo alongaram cerca de 7 cm de comprimento (Figura 4). As brotações alongadas foram enraizadas em substrato contendo fibra de coco apresentando eficiência de enraizamento em 80% (Figura 5).

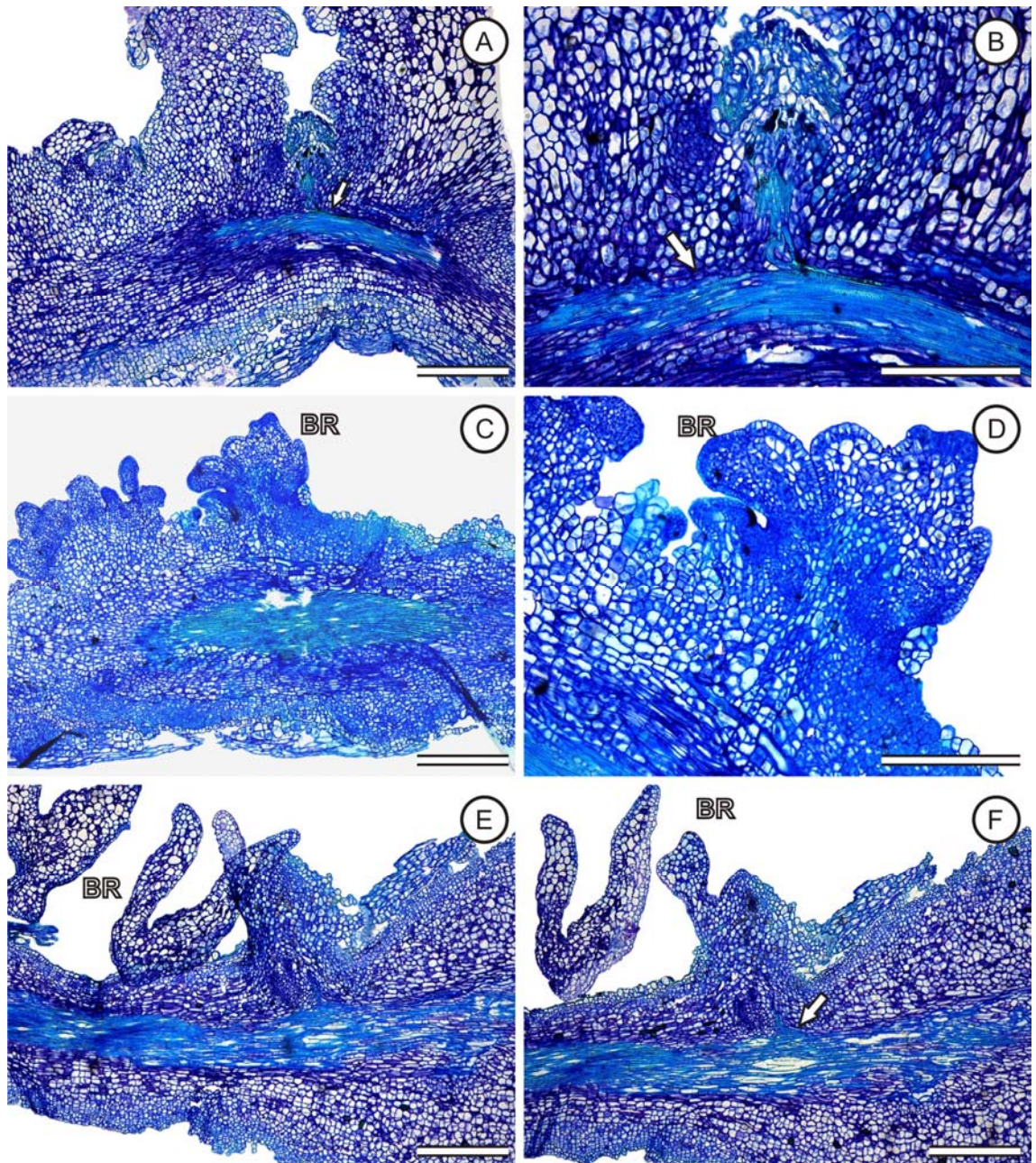


Figura 3: Organogênese direta de explantes radiculares de *Passiflora cincinnata* Mast. **A-B**, e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. genótipos FB 100 e FB 300 **C-F**. Cortes longitudinais dos explantes radiculares inoculados em meio MS suplementado com 4,44 μ M de BA. **A**. explante radicular com modificações celulares no córtex dando origem a brotação. **B**. Detalhe da organogênese direta. **C,D**. modificações celulares dando origem as brotações. **E,F**. detalhe das brotações. BR- brotações, setas – divisões celulares. Barras: **A, C, E, F** = 0,5 mm; **B, D** = 0,3 mm.



Figura 4: Fase de alongamento das brotações em meio MS líquido suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA3, após 10 dias. **A,B.** Brotações de *Passiflora cincinnata*. **C,D.** Brotações de *Passiflora edulis*. Barras A,C,D = 1 cm; B = 0,5 cm.

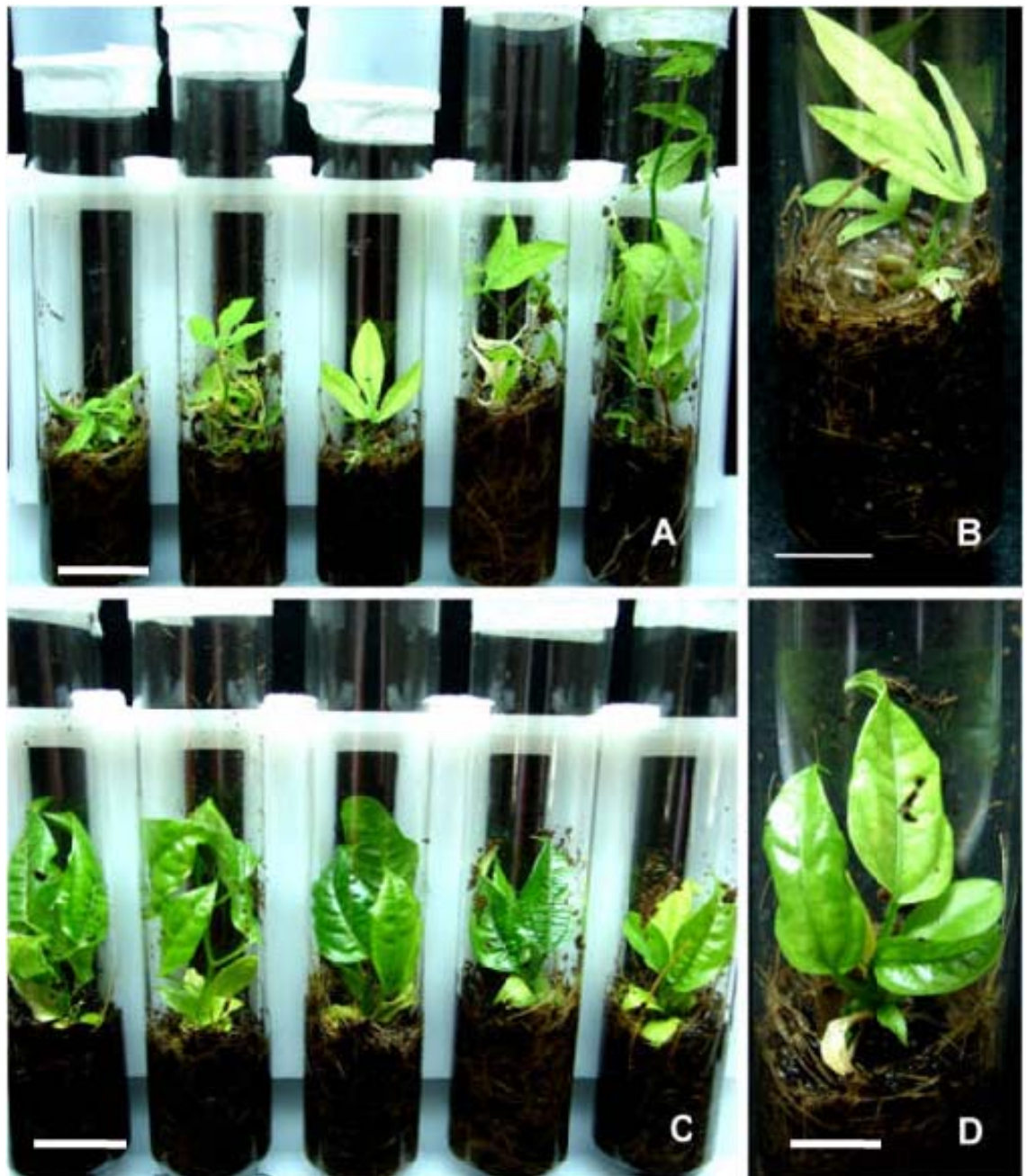


Figura 5: Enraizamento em substrato de fibra de coco e Plantmax (1:1) de brotações alongadas provenientes da organogênese *in vitro* de explantes radiculares. **A,B.** *Passiflora cincinnata* Mast. **C,D.** *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. Barras = 1 cm.

Biasi (1999), estudando o enraizamento dos brotos de caqui em meio MS contendo 1 μ M de AIB enraizarem, observou efeito negativo sobre os explantes, como oxidação e formação de calos. Ao contrário, a fibra de coco utilizada neste trabalho, permite melhor enraizamento e com plantas vigorosas.

Não houve diferença de enraizamento entre as espécies estudadas, apresentando grande potencial de enraizamento. As plantas enraizadas em substrato fibra de coco foram aclimatizadas em uma mistura de fibra de coco e Plantmax[®] por cerca de 20 dias em temperatura ambiente e levadas para casa de vegetação e após cerca de cinco dias as plantas se recuperaram e mantiveram o crescimento e o vigor (Figura 6).



Figura 6: Plantas aclimatizadas, aos 120 dias, advindas da organogênese *in vitro* em explantes radiculares. **A.** *Passiflora cincinnata* Mast; **B.** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* FB 100; **C.** *P. edulis* f. *flavicarpa* FB 200. Barra = 5 cm

Kantharajah e Dood (1990), Dornelas e Vieira (1994) e Hall et al. (2000), relataram a utilização de água de coco suplementado ao meio de cultivo

auxiliando na obtenção de gemas *in vitro* nas espécies de *Passiflora*. Portanto como sugestão para trabalhos futuros a utilização da água de coco suplementada ao meio de cultivo como solução orgânica, melhorando o processo de organogênese da *Passiflora cincinnata* Mast. e *Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.

Pode-se concluir que a organogênese em *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. edulis f. flavicarpa* ocorreu de forma direta, confirmada através da microscopia eletrônica de varredura e de cortes histológicos, mostrando o surgimento de brotações nos explantes radiculares e estes mantendo a conexão vascular. Estudos histológicos dos explantes são imprescindíveis para confirmação da organogênese direta das espécies. Devidos às espécies responderem à regeneração em épocas diferentes, o processo torna-se assíncrono, no qual a suplementação do regulador de crescimento BA ao meio de cultivo é indispensável para a resposta organogênica de explantes radiculares.

Análises de citometria de fluxo foram realizadas em plantas regeneradas via organogênese e comparadas com plantas de origem seminífera, para avaliar a influência do processo de regeneração via organogênese na estabilidade do nível de ploidia das plantas. Observa-se que na análise das suspensões nucleares obtidas das folhas, os picos de leitura da quantidade de DNA em G₁, resultaram em histogramas com resolução suficiente para confirmar a ploidia das plantas analisadas.

Dentre as amostras analisadas dos regenerantes de *P. cincinnata* houve pequena variação no conteúdo 2C de DNA nuclear das plantas a quantidade de DNA 2,96 a 3,01 pg (CV entre 2,15 e 3,11%). Para FB 100 houve variação na quantidade de DNA nas amostras entre 3,27 e 3,29 pg (CV entre 2,35 e 2,89%); para FB 200 entre 3,26 a 3,29 pg (com CV de 2,78 a 3,56%), e FB 300 entre 3,27 a 3,29 (com CV entre 2,34 a 3,15%). Os valores médios de quantidades de DNA e CV para cada genótipo estão apresentados na Tabela 2.

A técnica de citometria de fluxo tem sido muito útil na detecção de variações de níveis de ploidias em cultura de tecidos, células e órgãos vegetais (Loureiro et al., 2005; Dolezel et al., 2007; Clarindo et al., 2008; Campos et al., 2009). Em maracujazeiro utilização da citometria de fluxo em trabalhos envolvendo a culturas de tecidos foi relatada por Otoni et al. (1995) e por Paim Pinto et al. (2009). Paim Pinto et al. (2009) estimaram o conteúdo 2C de DNA

nuclear das plantas obtidas da germinação de sementes de *P. cincinnata* da ordem de 3,01 pg.

O conteúdo 2C de DNA de algumas espécies de *Passiflora* variou entre 1,83-5,86 pg e o tamanho do genoma entre 896-5252 Mpb (Souza et al., 2004). Conforme determinado no presente trabalho, os valores de 2C apresentados por *P. cincinnata* confirmaram aqueles de Paim Pinto et al. (2009) em regenerantes dessa espécie obtidos por embriogênese somática, e para *P. edulis* f. *flavicarpa* (3,21 pg), em trabalhos de determinação da quantidade de DNA (Souza et al., 2004, 2008).

Os histogramas obtidos a partir da citometria de fluxo do material foliar de plantas obtidas via germinação de sementes, e daquelas de organogênese a partir de explantes radiculares de quatro genótipos de maracujazeiros são mostrados na Figura 7 A-H.

Tabela 2: Médias da quantidade de DNA determinada por análise de citometria de fluxo de plantas regeneradas via explantes radiculares de maracujazeiros *Passiflora cincinnata* Mast. e *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (FB 100, FB 200 e FB300)

Material Vegetal	Média da quantidade de DNA (pg)	CV (%)
PC (*Controle)	2,98	2,23
PC (Regenerantes ¹)	2,99	2,51
FB 100 (Controle*)	3,27	2,77
FB 100 (Regenerantes ²)	3,28	2,71
FB 200 (Controle)	3,28	2,90
FB 200 (Regenerantes ³)	3,26	3,10
FB 300 (Controle*)	3,28	3,12
FB 300 (Regenerantes ⁴)	3,29	3,05

* Média de dois indivíduos derivados de propagação seminífera 1, 2, 3 e 4. Médias de 10, 11, 6 e 5 regenerantes aclimatizados em casa de vegetação, respectivamente. Para cada regenerante foram processadas 3 amostras independentes.

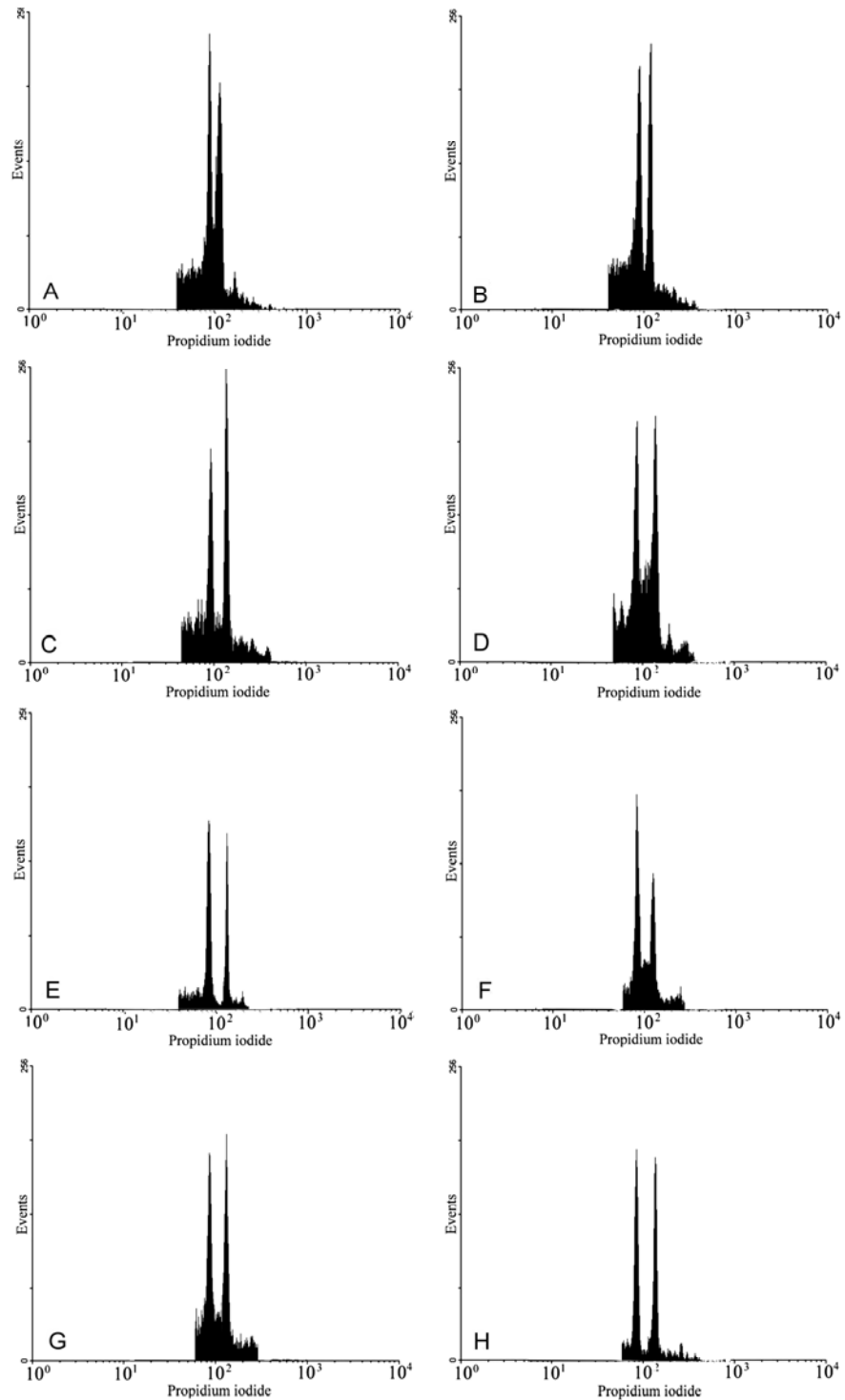


Figura 7: Histogramas de citometria de fluxo de plantas aclimatizadas obtidas mediante germinação *in vitro* (Controles: A, C, E e G) de *Passiflora cincinnata* (A; 2,98 pg), *P.edulis* f. *flavicarpa* FB100 (C; 3,27 pg), FB 200 (E; 3,28 pg) FB300 (G; 3,28 pg), e de organogênese adventícia a partir de explantes radiculares de *P. cincinnata* (B; 2,99 pg), FB100 (D; 3,27 pg), FB200 (F; 3,28 pg) e FB300 (H; 3,29 pg). O primeiro pico em cada histograma corresponde ao padrão interno *Glycine max* cv. Polanka (2,5 pg).

Os resultados indicam que a via de regeneração utilizada, na população analisada, não induziu variações na quantidade de DNA em relação às plantas controle estabelecidas mediante a germinação de sementes dos quatro genótipos analisados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.V. (eds.) **Propagação *in vitro* do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Alegre: Editora EDUFES, pp. 119-176, 2009.
- APPEZZATO-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.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, pp. 387-407, 2005.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUES, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.
- BECERRA, D.C.; FERNANDO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological conditions of donor affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, , p.87-90, 2004.
- CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, p. 101-104, 2009.
- CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R.; ARAÚJO, F.S.; ABREU, I.S.; OTONI, W.C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.92, p. 207-214, 2008.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (eds.) **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim. p.41-65. 2007a.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, p.2233-2244, 2007b.
- 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.

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

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

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

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. (eds.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp. 61-77. 1991

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

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Estudo anatômico e fisiológico da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* Mast. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, Atibaia. **Resumos**. Campinas: Vieira Gráfica e Editora Ltda, v.15, p.130. 2003.

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

LOUREIRO, J.; PINTO, G.; LOPES, T.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. **Planta**, v. 221, p. 815–822, 2005.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R. da S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55 – 78, 2005.

MONTEIRO, A.C.B.A., NAKASAWA, 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.

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

NEF-CAMPA, C.; CHAINTREUIL-DONGMO, C.; DREYFUS, B.L. Regeneration of the tropical legume *Aeschynomene sensitive* Sw. from root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p.149-154, 1996.

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.; BLACKHALL, N.W.; D'UTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.D.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.46:777-785, 1995.

PAIM PINTO, D.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; OTONI, W.C. Evaluation of genetic stability of somatic embryogenesis-derived plants of *Passiflora cincinnata* Mast. by means of flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2009.

PASSOS, I.R. S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 360-384.

PARK, S.; AHN, J.; LEE, W.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v.168, p.1221-1225, 2005.

PERES, L.F.P.; MORGANTE, P.G.; VECHI, C.A.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M. A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.37-44, 2001.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)** Viçosa, UFV. 90p. 2001.

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

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2009

SOUZA, M.M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, v. 141, p. 31-38, 2004.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; VIEIRA, M.L.C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 247-258, 2008.

SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. **International Review of Cytology**, v.196, p.67-84, 2000.

TSUBOI, H.; NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Científica**, 20: 63-72, 1992.

VIEIRA, M.L. C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. CABI Publishing, Oxfordshire. pp. 436-453. 2004.

VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; MATTA, F.P.; PÁDUA, J.G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.1-453, 2005.

ZERBINI, F.M.; OTONI, W.C.; VIEIRA, M.L.C. Transgenic passionfruit. In: KOLE, C.; HALL, T. (eds.). **A Compendium of Transgenic Crop Plants - Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**. 1 ed. Berlin: John Wiley & Sons, v. 5, p. 213-234, 2008.

CAPÍTULO III

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. cincinnata* Mast. MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*

1. RESUMO

Um requisito essencial em transformação genética de plantas é a determinação do agente seletivo e sua concentração adequada, que permita somente a regeneração das células transformadas. O potencial propagativo *in vitro* dos hipocótilos das espécies *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* permitiram utilizar esses explantes na fase de regeneração em protocolos de transformação genética. O objetivo desse trabalho foi determinar concentrações efetivas dos antibióticos utilizados como agentes seletivos, e daqueles utilizados para eliminar as agrobactérias após transformação genética e também propor o estabelecimento de um protocolo de transformação de maracujazeiro utilizando *Agrobacterium rhizogenes* R1601 carregando a construção quimérica *nos-nptII-nos*, o qual confere resistência à canamicina, e *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo gene de *APELATA* com construção quimérica *pROKII-AP1-GUSint*. Para a eliminação das agrobactérias após fase de co-cultivo, cada antibiótico foi avaliado individualmente em duas concentrações: meropenem (25; e 50 mg L⁻¹), timentin (150; e 300 mg L⁻¹) e cefotaxima (250; e 500 mg L⁻¹). Para *Passiflora cincinnata* as concentrações mais eficientes foram 50 mg L⁻¹ de meropenem e a de 500 mg L⁻¹ de cefotaxima. Enquanto que para *Passiflora edulis* f. *flavipacarpa*, as concentrações mais eficientes foram: 50 mg L⁻¹ de meropenem e 500 mg L⁻¹ de cefotaxima, para o genótipo 'FB 100'. Para os genótipos 'FB200' e 'FB 300', as respostas não diferiram do controle. Portanto, os efeitos dos antibióticos sobre a regeneração de tecidos *in vitro* são fundamentais para as espécies estudadas. Permitindo trazer melhorias na porcentagem de explantes que resultam na emissão de brotos adventícios, para otimização de protocolos na transformação genética e propagação. O diagnóstico de PCR confirmou a presença do T-DNA e Ri-TDNA em todos os transformantes da espécie *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis*. Este sistema mostra-se promissor para o estudo de genes com funções desconhecidas, assim como

também, o estudo dos genes envolvidos na via da arquitetura floral, e também a facilidade de manipulação das raízes “hairy root” e a possibilidade de regeneração adventícia de brotações e de plantas transformadas.

Palavras chaves: “hairy root”, morfogênese *in vitro*, antibiótico.

2. INTRODUÇÃO

A tecnologia de engenharia genética é uma alternativa para o melhoramento de plantas pelo potencial de transferência de uma característica específica a genótipos elites. A introdução de genes em plantas por métodos diretos e indiretos vem sendo realizados com sucesso (Quecini e Vieira, 2001; Silva Filho e Falco, 2001).

Em maracujazeiros os métodos biotecnológicos têm sido indicados para complementar programa de melhoramento, sendo a transgenia um caminho viável na obtenção de variedades resistentes (Monteiro, 2005; Alfenas et al., 2005). Vários problemas ainda persistem nos protocolos de transformação genética das *Passifloras*, como o pequeno número de ramos gerados por explantes, a baixa eficiência de transformação e o alto número de escapes produzidos.

É fundamental que na introdução de genes exógenos em plantas a necessidade de sistema eficiente de regeneração e de seleção de plantas transformadas. Para a micropropagação e a transformação genética de plantas são necessárias pesquisas relacionadas à morfogênese *in vitro* procurando estabelecer e otimizar protocolos.

O estabelecimento do agente seletivo adequado é um requisito essencial em trabalhos de transformação de plantas como também a determinação da sua concentração na qual a célula transformada será selecionada. A combinação do agente e sua concentração devem permitir somente o crescimento de células/tecidos transformados e evitar o escape dos não transformados. Entretanto, essa dosagem não pode ser excessiva a ponto de evitar também o crescimento dos explantes transformados (Takahashi, 2002).

As respostas morfogênicas dos tecidos cultivados *in vitro* são influenciadas por compostos adicionados ao meio de cultura, incluindo os antibióticos, existindo crescente número de trabalhos relatando os efeitos desses compostos na morfogênese vegetal (Sarma et al., 1995; Nauerby et al., 1997; Ling et al., 1998; Costa et al., 2000; Hoffmann e Vieira 2000; Lima et al., 2001; Yu et al., 2001; Danilova e Dolgikh 2004, Wiebke et al., 2006, Zhi-Neng et al., 2007).

Estes estudos são importantes para o processo de transferência de genes exógenos via transformação genética por *Agrobacterium* que requer a

utilização de antibióticos durante as etapas de seleção e obtenção das plantas transformadas (Ogawa e Mii 2005). A utilização de antibióticos em meio de cultivo é uma necessidade para eliminar a bactéria do meio, minimizando os riscos de interferência no meio de crescimento e na regeneração de tecidos de plantas, potencialmente transformadas, além de evitar a regeneração e o crescimento de plantas falsas positivas (Ogawa e Mii 2005).

Contudo, o pleno conhecimento e domínio das técnicas de cultura de tecidos e de morfogênese *in vitro* serão de grande importância para o gênero no desenvolvimento de estudos de clonagem, caracterização e incorporação de genes relacionados a resistência a viroses, bacterioses e também de genes envolvidos na biossíntese do etileno e aqueles genes envolvidos na arquitetura floral, além daqueles envolvidos na produção de metabolitos secundários (Reis, 2005).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar as melhores concentrações dos antibióticos, utilizados na eliminação das *agrobacterias*, otimização de um protocolo de transformação genética via *A. tumefaciens* e *A. tumefaciens*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal

Para a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener foram utilizadas sementes das populações FB 100, FB 200 e FB 300 Maguary, cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda (Araguari, MG). Esse material foi melhorado para atender as demandas da indústria de suco (Vieira e Carneiro, 2004). Para a espécie *Passiflora cincinnata* Mast. foram utilizadas como fontes de explantes, sementes maduras obtidas de frutos oriundos de polinização aberta e fornecidos pelo Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa.

A extração das sementes deu-se de acordo com o protocolo proposto por Tsuboi e Nakagawa (1992). Após a extração manual do suco, as sementes foram postas para fermentar em sua própria polpa, em recipiente plástico e à temperatura ambiente, por um período de três dias. Em seguida, as sementes foram friccionadas com areia lavada até que toda mucilagem do arilo fosse retirada e postas para secar à sombra, em ambiente de laboratório, por três dias. Foram utilizadas para a germinação e obtenção dos explantes utilizados nos experimentos de regeneração contendo diferentes antibióticos.

3.2 - Germinação das sementes in vitro e obtenção dos explantes

O processo de desinfestação iniciou-se quando as sementes foram imersas em etanol 70 % (v/v) durante 1 min, seguido de incubação por 15 min em solução hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 2,5 % (v/v) acrescido de Tween 20 a 0,1 % (v/v). As sementes foram, então, enxaguadas 5 vezes em água destilada autoclavada e colocadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio MS autoclavado (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas do complexo B5 (GAMBORG et al., 1968), 3 % (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Chem. Co., EUA), pH 5,7 ± 0,1, e solidificado com 0,25 % (p/v) de Fitagel. Após esse procedimento, os frascos vedados com embalagem sanfonada de polipropileno com filtro microbiano contendo as sementes foram colocados para germinar no escuro, sob temperatura de 25 ± 2 °C, por um

período de 15 dias. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento com a mesma temperatura e fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para o enverdecimento do material. As plântulas com 30 dias de idade foram usadas para a obtenção dos explantes.

3.3 - Linhagem e multiplicação bacteriana em meio de cultura

Utilizou-se a estirpe bacteriana de *Agrobacterium rhizogenes* R1601 caracterizada por possuir o plasmídeo pRiA4b contendo o gene quimérico (*nos-nptII-nos*) co-integrado no fragmento 21 no sítio *HindIII* do T-DNA, confere o fenótipo de supervirulência, sendo capaz de metabolizar agropina (Pythoud et al., 1987). A bactéria foi crescida em meio Rhizo (Tepfer e Casse-Delbart, 1987) suplementado com canamicina 100 mg L^{-1} (Sigma, EUA) e ampicilina 100 mg L^{-1} (Sigma, EUA) por 16-18 h a 200 rpm (28 °C) até densidade óptica ($\text{OD}_{\lambda:600\text{nm}}$) de 0,4. Em seguida a suspensão bacteriana foi centrifugada em tubos com capacidade para 15 mL a 5.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em igual volume de meio MS líquido [2 % de sacarose (p/v), vitaminas B5, e 100 mg L^{-1} de mio-inositol], pH $5,7 \pm 0,1$], sem antibiótico.

Para *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 caracterizada por possuir o plasmídeo pROKII contendo o gene quimérico (*CaMV 35S-AP1-GUSint*). A bactéria foi crescida em meio Rhizo (Tepfer e Casse-Delbart, 1987) suplementado com canamicina 50 mg L^{-1} (Sigma, EUA) e gentamicina 50 mg L^{-1} (Sigma, EUA) por 16-18 h a 200 rpm (28 °C) até densidade óptica ($\text{OD}_{\lambda:600\text{nm}}$) de 0,4. Em seguida a suspensão bacteriana foi centrifugada em tubos com capacidade para 15 mL a 5.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em igual volume de meio MS líquido [2 % de sacarose (p/v), vitaminas B5, e 100 mg L^{-1} de mio-inositol], pH $5,7 \pm 0,1$], sem antibiótico.

3.4 - Infecção bacteriana e cultura de raízes transformadas

Em condições assépticas, hipocótilos com 2-3 cm foram obtidos das plântulas estioladas, e marcados em bisel na região apical para facilitar a inoculação da bactéria com o uso de seringa. Cada explante sofreu, em média, 5 microinjeções na porção distal do hipocótilo, usando-se seringa com agulha

hipodérmica contendo a suspensão bacteriana. Em seguida, os explantes inoculados foram colocados na posição vertical e na orientação da polaridade fisiológica, com a região proximal em contato com o meio. Foram usados frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura MS adicionado de vitaminas do complexo B5, 3 % (p/v) de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, sem fitorreguladores, pH 5,7 ± 0,1, e solidificado com 0,25 % (p/v) de Fitigel. Os frascos foram selados com filme plástico PVC (Goodyear, Brasil). Como controle, hipocótilos foram inoculados usando microinjeções, apenas com meio MS líquido. Os explantes inoculados foram mantidos por 3 dias no escuro antes de serem transferidos e mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Após 45 dias, as raízes emitidas pelos hipocótilos inoculados com suspensão bacteriana foram transferidas para meio MS com vitaminas de B5, 3 % (p/v) de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0,1, solidificado com 0,25 % (p/v) Fitigel, adicionado de 100 mg L⁻¹ de canamicina. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Também, como controles, raízes não transformadas, obtidas de plântulas germinadas, foram colocados sob as mesmas condições de propagação.

3.5 - Cultivo de raízes transformadas

Após a multiplicação da massa de raiz em meio semi-sólido, elas foram transferidas para Erlenmeyers (Vidrolabor, Brasil) de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio de cultura MS líquido, suplementado com vitaminas do complexo B5, sacarose 3 % (p/v), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0,1, com 1,0 mgL⁻¹ de 6-BA, ambos suplementados com 100 mg L⁻¹ de canamicina e 50 mg L⁻¹ de meropenem, por 10 dias a 100 rpm. Partes das raízes foram transferidas para meio de cultura semi-sólido descrito acima, suplementados com 100 mg L⁻¹ de canamicina e 50 mg L⁻¹ de meropenem; enquanto que o restante das raízes permaneceu nos Erlenmeyers. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹. A eficiência morfogênica dos explantes nos meios estudados foi avaliada de acordo com o surgimento das gemas.

3.6 - Obtenção das plantas transgênicas

Brotos e gemas emitidos dos explantes radiculares transformados, provenientes dos meios semi-sólidos e líquidos, foram transferidos para frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura MS, suplementado com vitaminas do complexo B5, sacarose 3 % (p/v) (Vetec, Brasil), mio-inositol 100 mg L⁻¹, pH 5,7 ± 0,1, solidificados 0,25 % (p/v) de Fitigel suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA e 50 mg L⁻¹ de meropenem, 1,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃); e selados com filme plástico PVC.

Após 30 dias, os brotos multiplicados foram transferidos para meio de alongamento das brotações, composto dos sais de MS, vitaminas do complexo B5, 3 % (p/v) de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0,1, e fibra de coco desprovido de fitorreguladores e antibióticos, em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

3.7 - Isolamento de DNA e análise de PCR

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações, antes da quantificação e confecção da reação de polimerização em cadeia (PCR). As reações de amplificação a partir de DNA de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (folhas e raízes transformadas) foram conduzidas no termociclador Mastercycler® (Eppendorf), com período inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s; 60°C por 30 s; e 72°C por 20s) e um período adicional de extensão a 72°C, por 3 min. Cada reação continha, em 20 μL, 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 % de Tween; 2,5 mM de MgCl₂; 2 μM de primer; 1 U de Taq polimerase (Phoneutria); 2 mM de dNTP; aproximadamente 20 ng de DNA genômico e água deionizada para completar o volume.

Para as reações de PCR, foram utilizados os primers do promotor 35S. As seqüências dos primers estão listadas a seguir:

35S-F: 5' – AAG ACG ATC TAC CCG AGC AA – 3'

35S-R: 5' – CAA CGA TGG CCT TTC CTT TA – 3'

Os produtos de amplificação do DNA foram analisados em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta e suas imagens digitalizadas em no sistema de captura de imagens L-Pix Image – Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia). O tamanho dos fragmentos foi estimado pela comparação das bandas migradas no gel com o marcador molecular GeneRuler™ DNA Ladder Plus (100 pb) (Fermentas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Influência dos antibióticos meropenem, timentin e cefotaxima na morfogênese de hipocótilos

Considerando o número de hipocótilos que emitiram brotações adventícias, *Passiflora cincinnata* apresentou melhor desempenho nas concentrações de 50 mg L⁻¹ de meropenem e 500 mg L⁻¹ de cefotaxima, com médias de brotações de 32,8 e 34,8.

Os genótipos avaliados de *P. edulis* f. *flavicarpa* as concentrações do antibiótico utilizado, 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ de meropenem e 500 mg L⁻¹ de cefotaxima apresentaram os melhores resultados para o genótipo FB 100 apresentando uma médias de brotos regenerados de 9,6 e 9,2, enquanto que as populações FB 200 e FB 300 não diferiram estatisticamente do controle mas as concentrações 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ meropenem foram melhores para o FB 200 com médias de 12,2 e 11,4 e 500 mg L⁻¹ de cefotaxima para FB 300 com 12,8 brotos regenerados (Tabela 1).

Tabela 1: Médias de brotações regeneradas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações dos antibióticos meropenem, timentin e cefotaxima em explantes hipocotiledonares das espécies *Passiflora cincinnata* Mast. (PC) e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (FB 100, FB 200 e FB 300)

Concentração de antibiótico mg L ⁻¹	Genótipo							
	PC		FB 100		FB 200		FB300	
0	14,60	Da	3,40	Cc	6,20	Ab	13,00	Ab
MERO 25	23,40	Ca	9,60	ABCb	12,20	Ab	8,60	Ab
MERO 50	32,80	ABCa	9,60	ABCb	11,40	Ab	10,60	Ab
TIM 150	26,60	Ca	3,60	BCc	8,40	Abc	10,40	Abc
TIM 300	22,20	BCa	3,60	BCc	6,60	Abc	10,00	Abc
CEFO 250	27,40	Ca	5,80	ABCb	9,00	Ab	10,20	Ab
CEFO 500	34,80	Aba	9,20	ABCb	8,60	Ab	12,80	Ab

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula, nas colunas, e uma letra minúscula, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Mendes et al. (2009) estudando epicótilos de duas variedades *Citrus sinensis* em diferentes concentrações de antibióticos (cefotaxima, meropenem e timentin), observaram que os antibióticos meropenem e timentin não diferiram do controle observaram alta regeneração de brotos adventícios, e o antibiótico cefotaxima afetou negativamente a regeneração dos brotos. No presente trabalho a concentração de meropenem não diferiu estatisticamente do cefotaxima. O meropenem foi utilizado nos experimentos de transformação genética no presente trabalho.

Danilova & Dolgikh (2004), estudando calos embriogênicos de milho (*Zea mays* L.) observaram que diferentes concentrações do antibiótico cefotaxima não afetaram significativamente a produção de calos pelos embriões mas que a concentração de 150 mg L⁻¹ de cefotaxima aumentou em cinco vezes o peso dos calos produzidos. As concentrações de 150 mg L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ foram eficazes na ativação da regeneração dos explantes, e que essa ativação dependia do genótipo estudado. No presente trabalho o antibiótico cefotaxima 500 mg L⁻¹ favoreceu a regeneração de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares das espécies estudadas.

Em protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium*, a utilização de antibióticos para sua eliminação pode não ser tóxica para as células vegetais, mas também pode alterar o balanço auxinas/citocininas, reduzindo a eficiência de regeneração e, por consequência, a frequência de transformação (Lin et al., 1995). Lima et al. (2001) observaram tolerância de calos de cana-de-açúcar a antibióticos, relataram que os antibióticos utilizados em sistemas de transformação genética, canamicina e higromicina, inibiram a indução de calos e morfogênese *in vitro*. Não foi observado no presente trabalho interferência desses antibióticos na morfogênese *in vitro*.

Estudo utilizando combinações de antibióticos foi mais efetivo que antibióticos isolados na indução de brotações em plantas de morango, envolvendo a combinação de timentin, estreptomina (Tanprasert e Reed 1998). A maioria dos estudos relata a interferência dos antibióticos na morfogênese *in vitro*, alguns autores relatam a utilização de antibióticos como timetin, carbelicilina e cefotaxima, para a eliminação ou supressão de *Agrobacterium* (Alsheikh et al., 2002; Leamkhang e Chatchawankanphanich, 2005). Segundo Danilova e Dolgikh, 2004 a utilização da combinação de antibióticos no meio de cultivo dos explantes tem sido positiva na resposta

morfogênica, uma vez que a utilização do antibiótico cefotaxima na regeneração *in vitro* de plantas de trigo não afetou sua resposta morfogênica. Entretanto Xia et al. (2006) estudando plantas de *Populus euphratica* verificaram que o antibiótico cefotaxima inibiu a indução de brotos.

4.2 - Confirmação das plantas transgênicas via PCR

As respostas obtidas da inserção do Ri T-DNA o qual carrega a construção quimérica *nos-nptII-nos* nas raízes “hairy root” foi diagnosticado por PCR, usando oligonucleotídeos específicos para o gene *nptII* (Figura 1). Foi confirmada a presença do gene *nptII* em dezessete transformantes independentes de raízes de maracujazeiro com início de indução de brotos, foi incorporado o fragmento de 550 bp, a partir dos respectivos DNA genômicos referente à amplificação da seqüência da construção quimérica (Figura 1). As amostras de DNA genômico das raízes da espécie *Passiflora edulis* amplificadas e utilizadas como controles negativos, sendo confirmado pela ausência da banda amplificada para essas amostras. Foi confirmada a presença do inserto para todas as raízes “hairy root” analisadas.

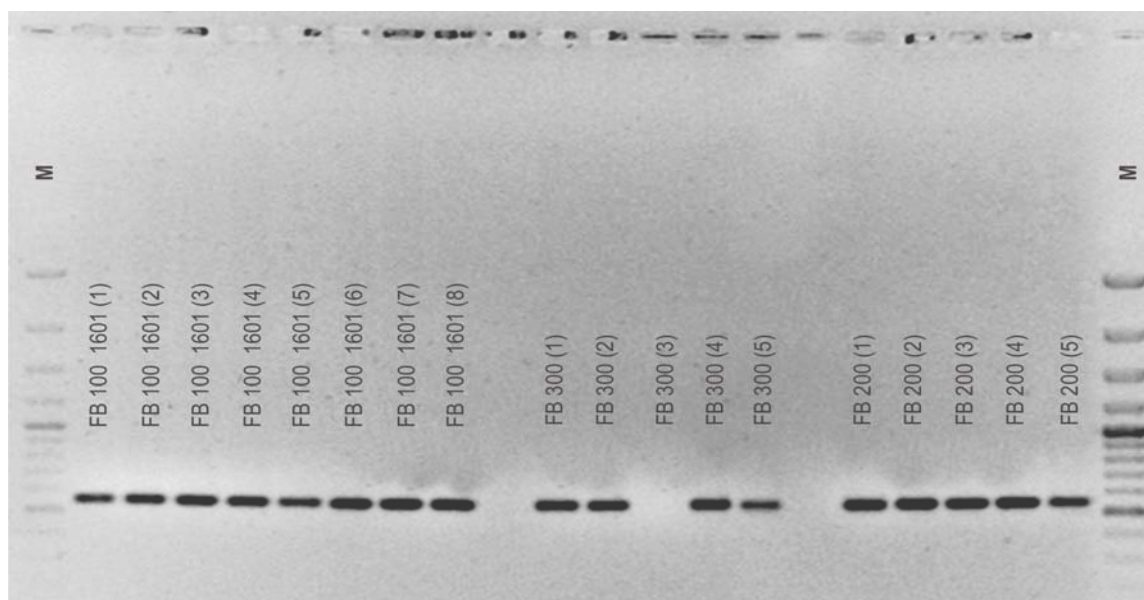


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de raízes “hairy root” de *Passiflora edulis* infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* R1601 contendo a construção quimérica *nos-nptII-nos*, e controles, amplificados por PCR. Fragmentos de 550 pb confirmam a presença do transgene. (M) é o marcador padrão de 100 pb; transformantes da planta de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Foi observada melhor resposta do genótipo FB 100 em relação aos genótipos FB 200 e FB 300. Todas as raízes do genótipo FB 100 com início de regeneração de brotos apresentaram o gene de infecção da *A. rhizogenes*, com oito amostras confirmaram a presença do transgene, enquanto que FB 300 apenas quatro amostras deram positivas e o FB 200 cinco amostras foram positivas.

Hipocótilos de *Passiflora edulis* genótipos FB100, FB 200, FB 300 foram inoculados com *Agrobacterium rhizogenes* no qual as raízes foram confirmadas através da técnica de PCR que são geneticamente transformadas (Figura 2).

Na transformação genética mediada por *Agrobacterium 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. A semelhança do observado para *Passiflora edulis f. flavicarpa*, houve regeneração espontânea de ramos, via organogênese direta a partir das raízes de *Passiflora cincinnata*, inclusive com alongamento de algumas poucas gemas (Otoni, 1995; Otoni et al., 2007).

Dentre as aplicações da transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* estão os aumentos 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 tem recebido especial atenção por parte de pesquisadores interessados em melhorar ou desenvolver novas variedades de plantas ornamentais (Casanova et al., 2005).

Cheng et al. (2004) destacou cinco fatores na transferência de genes mediado por *Agrobacterium*: indução do gene *Vir*, ativação da divisão celular do tecido alvo, composição do meio de cultivo, vetores e estirpes de *Agrobacterium* e genótipo.

A produção de raízes “hairy root” vem sendo utilizada para produção de propriedades bioquímicas dos genes como também na expressão das vias metabólicas e no estudo de enzimas e intermediários envolvidos na biogênese de metabólitos secundários (Reis et al. 2007). A obtenção de “hairy root” tem

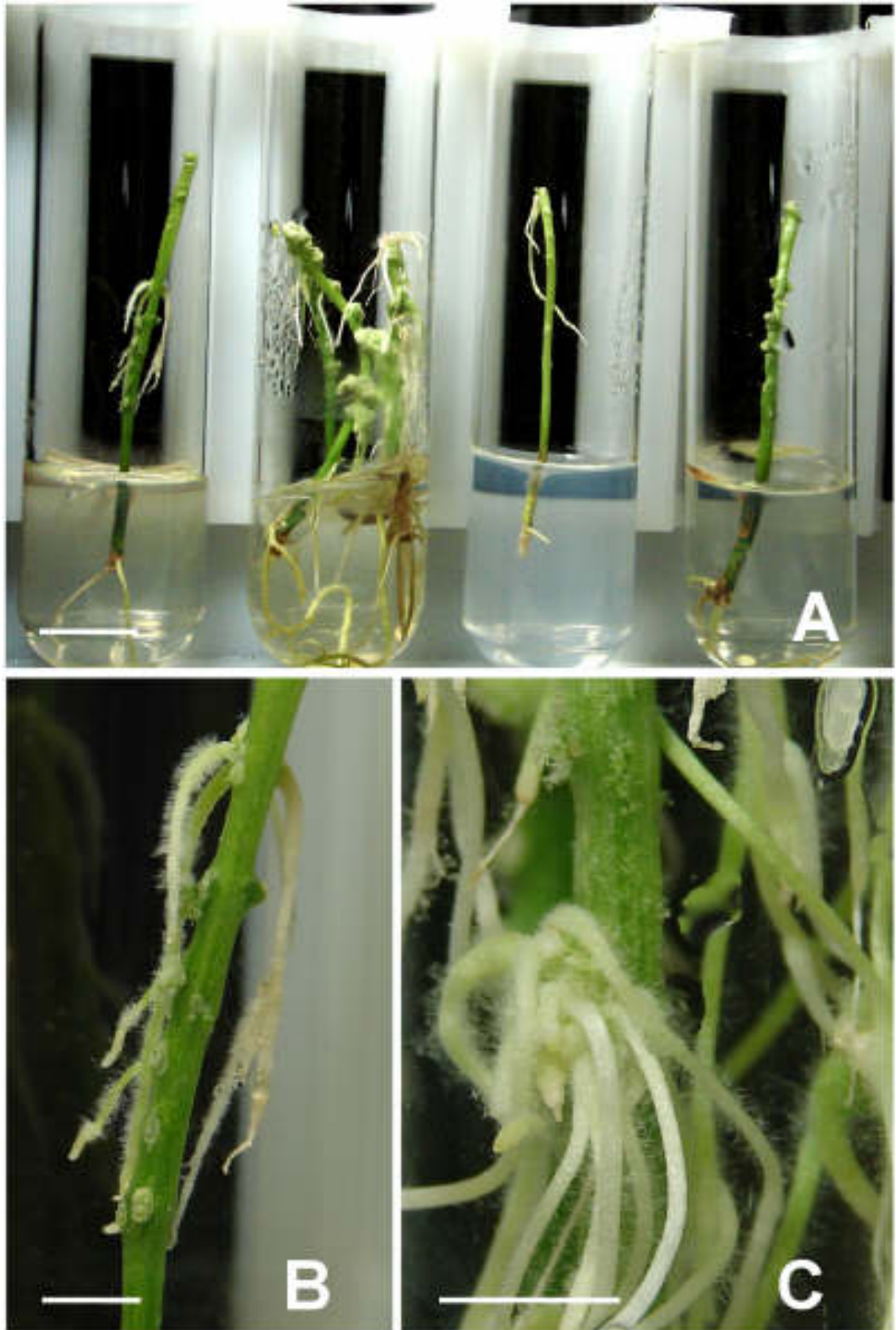


Figura 2: Aspecto de explantes de hipocótilo de *Passiflora edulis* inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes*. A. hipocótilos inoculados com raízes em meio MS desprovido de antibiótico e regulador vegetal. B,C. detalhes das raízes transformadas.

grande potencial para a produção de metabólitos secundários, em produtos farmacológicos, já que proporciona alta taxa de crescimento, fácil manipulação genética da cultura e, principalmente, a habilidade aumentada para produzir metabólitos úteis que não podem ser produzidos por células, mas somente por plantas completamente formadas (Sevon et al., 2002; Hu e Du, 2006).

Entretanto, problemas potenciais como a existência da variação na habilidade de síntese entre diferentes clones, possível perda de cromossomos, modificações fenotípicas na planta regenerada, e a co-supressão entre genes endógenos e exógenos (Xu et al., 1996; Ayora-Talavera et al., 2002; Moyano et al., 2003; Hu e Du, 2006). A obtenção de raízes “hairy roots” e brotações a partir da transformação genética por *A. rhizogenes* são pré-requisitos fundamentais para o sucesso da produção de plantas transgênicas (Filippini et al., 1996). As brotações adventícias regeneradas através de raízes “hairy root” podem apresentar problemas na fertilidade e algumas vezes não apresentarem dominância apical e alterações no geotropismo positivo (Hu & Du, 2006).

Para maracujá, um sistema de transformação e regeneração de plantas transgênicas sistematizado e reproduzível é importante visto a carência de protocolos de transformação genética para essa espécie.

A obtenção de diversas brotações a partir de uma mesma raiz como clones transgênicos é uma vantagem visto que é possível a organogênese direta das espécies *P. cincinnata* e *P. edulis*, facilitando o estudo de inserção de genes exógenos para as espécies, tornando esse sistema promissor, podendo obter plantas superiores através da transformação genética, além de possibilitar o estudo da função dos genes envolvidos em vias metabólicas como os genes da biossíntese do etileno como também genes da identidade floral para estas espécies.

Plantas transformadas através de explantes hipocotiledonares pela imersão dos explantes em *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 o qual carrega o gene de interesse AP1 foram confirmadas através da técnica de PCR (Figura 3). Esse gene controla a identidade dos órgãos florais principalmente nos verticilos. Com a perda da atividade desse gene ocorre a formação de carpelos, em vez de sépalas, no primeiro verticilo e nos estames, em vez de pétalas, no segundo (Taiz & Zeiger 2006).

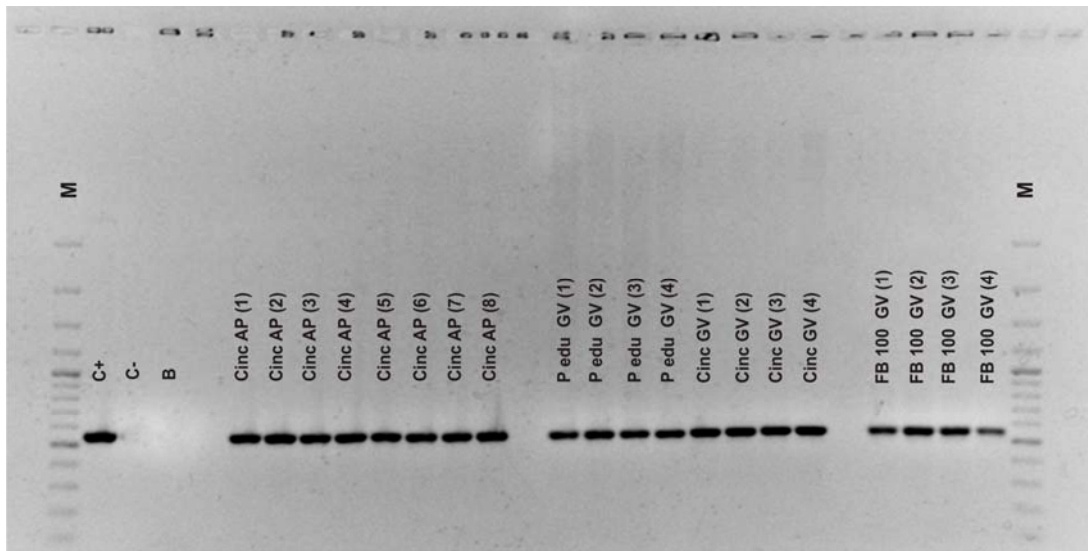


Figura 3: Análise eletroforética de produtos de amplificação via PCR em gel de agarose do DNA genômico de folhas de *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata* infectadas com *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo a construção quimérica *nos-nptII-nos*, e controles. Fragmentos de 550 pb confirmam a presença do transgene. (M) é o marcador padrão de 100 pb; (C+) representa o controle positivo e (c-) o controle negativo das plantas de *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata*, respectivamente

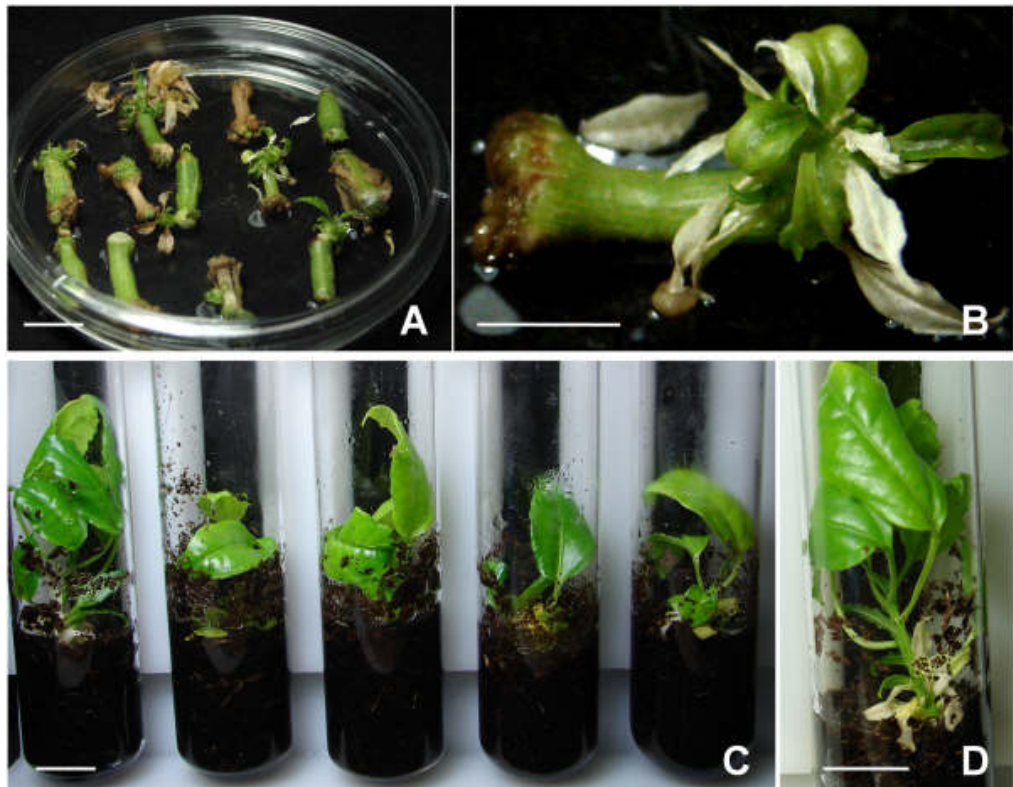


Figura 4: Aspecto de explantes transformados de *Passiflora edulis* inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. A. hipocótilos cultivados em meio seletivo MS suplementado com 300 mg L⁻¹ de timentin e 6 mg L⁻¹ de higromicina. B. detalhe da brotação em explantes de hipocótilo. C,D. plantas transformadas colocadas para enraizar em substrato fibra de coco.

Plantas transformadas estão sendo aclimatizadas em sala de cultivo (Figura 4). Nas flores, os verticilos na camada mais externa do meristema dão origem às sépalas, na segunda camada originam as pétalas, na terceira as células tornam-se estames e na quarta originam os carpelos. Cada estrutura floral é determinada pela combinação de genes homeóticos funcionais (Nakayama et al. 2005).

Os genes de identidade de órgãos florais foram identificados por meio de mutações, as quais alteraram a identidade de órgãos florais de tal modo que alguns verticilos não são formados ou desenvolvem-se de forma epítipe (Bowman e Eshed, 2000). Muitos dos genes que determinam a identidade de órgãos florais são MADS Box, que codificam fatores de transcrição, o qual permite que esses fatores se liguem ao DNA em sequências específicas de nucleotídeos (Shepard e Purugganan, 2002; Ditta et al., 2004).

A regeneração de novo para o gênero *Passiflora* é via organogênica, com diversos tipos de explantes e protocolos já descritos (Vieira e Carneiro 2004; Zerbini et al., 2008), e utilizada até então na transformação genética mediada por *Agrobacterium*.

Segundo Silva (1999) e Reis (2005), o maracujazeiro possui uma resistência natural ao antibiótico canamicina e sua interação com agentes gelificantes, com isso a busca por agentes seletivos alternativos vem sendo realizada para o maracujazeiro. A higromicina vem sendo utilizada como agente seletivo alternativo por alguns autores (Barbosa, 1999; Takahashi, 2002; Reis, 2004). Monteiro (2005) propôs a utilização do gene bar que confere resistência a fosfotricina para transformação do maracujazeiro. No presente trabalho não foi observada resistência das espécies estudadas aos antibióticos canamicina e higromicina.

A engenharia genética, envolvendo a transformação de células e posterior regeneração *in vitro* de plantas, tem grande potencial de contribuir para o sucesso dos programas de melhoramento, visto que a obtenção de transgênicos surge como alternativa para a obtenção de variedades melhoradas (Ferreira et al., 1998).

No caso específico dos maracujazeiros, a transformação genética de plantas se constitui uma alternativa de transferência de genes de resistência a doenças (Braz, 1999; Takahashi, 2002; Alfenas et al., 2005; Monteiro, 2005; Trevisan et al., 2006). A transformação genética do maracujazeiro foi relatada

primeiramente por Manders et al. (1994), abrindo novas perspectivas para o melhoramento genético do maracujazeiro.

Apesar da disponibilidade de protocolos de transformação genética para as *Passiflora*, os principais problemas enfrentados na transformação genética ainda são decorrentes da baixa frequência de transformantes e o elevado número de escapes (Monteiro, 2005). Nesse sentido, para a produção de plantas transgênicas é imprescindível um sistema de regeneração *de novo* eficiente, via embriogênese somática ou organogênese (Barwake et al., 1986) e a disponibilidade de um sistema de seleção combinado com explantes adequados, que contenham células competentes para transformação (Birch, 1997; Ko et al., 2003).

Devido a diversos fatores envolvidos na regeneração *in vitro* dos explantes, sugere-se em trabalho futuros combinações de diversos antibióticos com e sem a adição de fitorreguladores na melhoria dos protocolos de transformação e regeneração dos explantes. Como vantagem de obtenção das raízes “hairy root” é que através de uma única raiz podemos obter várias brotações potencialmente transgênicas. E as plantas transgênicas obtidas com introdução de genes de interesse principalmente para o maracujazeiro genes envolvidos na biossíntese do etileno e na arquitetura floral.

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.
- ALSHEIKH, M.K.; SUSO, H.P.; ROBSON, M.; BATTEY, N.H.; WETTEN, A. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *Fragaria vesca semperflorens*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1173-1180, 2002.
- APEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2007-2013. 1999
- AYORA-TALAVERA, T.; CHAPPELL, J.; LOZOYA-GLORIA, E.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, p. 135–145, 2002.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORAL, 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**, 79: 87–90. 2004
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development** 112: 1-20, 1991.
- BRAZ, A.S.K. Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos de maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes. **Tese Mestrado, Universidade Federal de Viçosa**, p. 106, 1999.
- CARVALHO, D.C; BIASI, L.A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, v.34, p. 1401-1406, 2004.
- CASANOVA,E.; TRILHAS, M.I.; MOYSSET, L.; VAINSTEIN, A. Influence of *rol* genes in floriculture. **Biotechnology Advances**, V.23, p.3-39, 2005
- COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; CECON, P.R.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 327-332, 2000.
- CHENG, M.; LOWE, B.A.; SPENCER, T.M.; YE, X.; ARMSTRONG, C.L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cell. Development Biology** 40:31–45, 2004

- CHO, H.J.; WILDHOLM, J.M. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 259–269, 2002.
- CHRISTEY, M.C. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v.33, 173-179, 1997.
- DANILOVA, S.A.; DOLGIKH, Y.I. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 559-562, 2004.
- DITTA G, PINYOPICH A, ROBLES P, PELAZ S, YANOFSKY MF. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. **Curr Biol** 14: 1935–1940, 2004.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Passiflora amethystina* Mikan and *Passiflora cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, 13: 103-106. 1993
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11–15, 1987.
- FERNANDO, J.A. Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Campinas, UNICAMP**. 106p. 2005.
- FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; MACHADO, S.R.; APPEZZATO-DAGLORIA, B. New insight into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 37-44, 2007
- FILIPPINI, F.; ROSSI, V.; MARIN, O.; TROVATO, M.; DOWNEY, P.M.; CONSTANTINO, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. The *rolB* plant oncogene is a tyrosine phosphatase. **Nature**, v.379, p. 499-500, 1996.
- FRANKLIN, G.; SHEEBA, C.J.; LAKSHMI SITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 188–191, 2004 .
- FUKUDA, K-I; DAIMON, H.; MISHIBA, K-I; MII, M. Histological observation of root bud formation of hairy roots in *Lotus corniculatus* L. **Grassland Science**, v. 53, p. 51–53, 2007.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158. 1968
- 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. (Eds.) **A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP**, 1991. pp. 61-77. 1991
- 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* f. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, 48: 79-81. 2000

HOFFMANN, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Resposta *in vitro* e suscetibilidade ao *Agrobacterium* de duas cultivares de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 733-742, 2000.

HOSHINO, Y.; MII, M. Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 256–261, 1998.

HU, Z.-B; DU, M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, p. 121-127, 2006.

IEAMKHANG, S.; CHATCHAWANKANPHANICH, O. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 213-220, 2005.

JACOB, A.; MALPATHAK, N. Plantlet regeneration enhances solasodine productivity in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**, v.41, p. 291–295, 2005.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O., MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.73-77, 2001.

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.

LOMBARDI, S.P. Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* Mast. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)**. Piracicaba, ESALQ/USP, 60p. 2003.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; DUTRA 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.697-602, 1994.

MATSUMOTO, N.; OKADA, M.; TAKAHASHI, H.; MING, Q.X.; NAKAJIMA, Y.; NAKANISHI, Y.; KOMANO, H.; NATORI, S. Molecular cloning of a cDNA and assignment of the C-terminal of sarcotoxina IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrine*. **Biochemical journal**, v.239, p.717-722, 1986.

MONTEIRO, M. Transformação genética do maracujá amarelo visando a resistência a *Xanthomonas axonopodis* PV. *Passiflorae*. Piracicaba. **Escola Superior Luiz de Queiroz. Tese de doutorado** p.134 2005.

MOYANO, E.; JOUHIKAINEN, K.; TAMMELA, P. Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. **Journal of Experimental of Botany**, v. 54, p. 203–211, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497. 1962

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.

NAKAYAMA, N.; ARROYO, J.M.; SIMOROWSKI, J.; MAY, B.; MARTIENSSEN, R.; IRISH, V.F. **The Plant Cell**, v. 17, p.1-21, 2005.

NISIZAKI, S.M.A. Associação *in vitro* de fungos micorrízicos arbusculares com raízes de maracujá amarelo transformados com *Agrobacterium rhizogenes*. **Tese Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa**, p.40, 1999.

OGAWA, Y.; MII, M. Evaluation of 12 β -lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 736–743, 2005.

OTONI, W.C. Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Viçosa: **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa**, p.198. 1995.

OTONI, W.C.; SILVA, M.L., LIMA, A.B.P.; PAIM PINTO; LANI, E.R.G.; REIS, L.B. Transformação genética de maracujazeiros. In: TORRES, A.C.; DUSI, A.N.; SANTOS, M.D.M.(Eds.). **Transformação genética de plantas via *Agrobacterium*. Teoria e prática**. CIP/Embrapa:Brasília, p 125-141. 2007.

QUECINI, V.M.; VIEIRA, M.L.C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, cap. 8, p. 279-331, 2001.

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

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters). **Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV**, 105p. 2005

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Viçosa, UFV**. 90p. 2001

SARMA, K.S.; EVANS, N.E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) Carr. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p. 1779-1781, 1995.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Plantas transgênicas no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis. Fundação MT, p.1011-1056. 2001.

SILVA, M.B. Transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Viçosa, UFV** 45p. 1998

SEVON, N.; OKSMAN, C.; KIRSI, M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. **Planta Medica**, v. 68, p. 859–868, 2002

Shepard K. A. M. D. Purugganan. The genetics of plant morphological evolution. **Current Opinion in Plant Biology** 5: 49-55, 2002

TAKAHASHI, E.K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f *flavicarpa* Deg.) por biobalística. **Tese de doutorado em Genética e Melhoramento. USP**. 2002

TANPRASERT, P.; REED, B. M. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 53-55, 1998.

TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, v. 4, p. 24-28, 1987.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; REZENDE, J.A. Resistance to passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, 90:1026-1030. 2006

TSUBOI, H., NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Científica**, 20: 63-72. 1992

VIEIRA, M.L. C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: R. LITZ (Ed.) Biotechnology of Fruit and Nut Crops. **CABI Publishing, Oxfordshire**. pp. 436-453. 2004

WIEBKE, B.; FERREIRA, F.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; DROSTE, A. Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. **Bragantia**, v.65, p. 543-551, 2006.

XIA, D.; XIAO-YANG, C.; WEI, L.; ZHI-YAN, D. Effects of antibiotics on plantlet regeneration via organogenesis in *Populus euphratica*, **Forestry Studies in China**, v. 8, p. 27–31, 2006.

XU, Z.Q.; JIA, J.F. The reduction of chromosome number and the loss of regeneration ability during subculture of hairy root cultures of *Onobrychis viciaefolia* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A4. **Plant Science**, v. 120, p. 107–112, 1996.

YU, T-A; YE, 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.

ZHI-NENG, L.; GUO-FENG, F. MAN-ZHU, B. Adventitious shoot regeneration of *Platanus acerifolia* Willd facilitated by Timentin, an antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Forestry Studies in China**, v. 9, p. 14–18, 2007.

CAPÍTULO IV

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE PLURONIC® F-68 NA REGENERAÇÃO in vitro DE HIPOCÓTILOS DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora edulis* f. *SIMS. flavicarpa* DEG. E *P. cincinnata* MAST.)

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Pluronic® F-68 (0,0; 0,001; 0,01; 0,1; e 0,5%) na morfogênese *in vitro* da *Passiflora cincinnata* Mast. e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (FB 100, FB 200 e FB 300) . Foram utilizados segmentos de hipocótilo de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* com 1,0 cm de comprimento, obtidos de sementes germinadas *in vitro*. Estes explantes foram inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio MS semi-sólido, acrescido das concentrações supracitadas do surfactante. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 30 dias, foi avaliado o número de brotações adventícias. Para FB 300 as diferentes concentrações diferiram significativamente em relação à testemunha, sendo observado maior percentagem de brotações na concentração de 0,1%. Para FB 200 as concentrações de 0,01; 0,1 e 0,5% apresentaram maiores números de brotações diferindo estatisticamente da concentração 0,001% e testemunha. Enquanto para FB 100 a concentração de 0,01% foi superior estatisticamente em relação às outras concentrações. Portanto, nessas condições, a adição de Pluronic® F-68 foi eficiente para a indução de brotações adventícias nos explantes dos genótipos de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, podendo ser utilizado para melhorar a regeneração dos explantes *in vitro*.

Palavras chaves: organogênese, surfactante.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, uma vez que o maior centro de dispersão geográfica do maracujá localiza-se no Centro-Norte do país (Meletti, 1998). A cultura do maracujazeiro no Brasil tem grande importância pela qualidade de seus frutos ricos em sais minerais e vitaminas, sobretudo, A, C e do complexo B; pelas suas propriedades farmacológicas, como a maracujina, a passiflorine e a calmofilase, especialidades farmacêuticas de amplo uso como sedativo, depurativo, antiinflamatório e antiespasmódico; e também valor ornamental de suas flores (Ferreira & Oliveira, 1991; Lorenzi & Matos, 2002).

Para atingir tais objetivos, vários são os fatores associados à melhoria e/ou otimização das respostas morfogênicas *in vitro*, sejam eles de natureza inerente aos explantes, ou associados ao ambiente físico (interno e externo aos frascos) aos recipientes de cultivo e à constituição do meio de cultivo. A combinação adequada de substâncias reguladoras, compostos orgânicos, fonte de carbono em concentrações ótimas adicionada ao meio de cultura, promovem a condição ideal para a organogênese *in vitro* (George et al., 2008).

Nesse sentido, o surfactante não-iônico Pluronic[®] F-68 tem sido utilizado como co-polímero polioxietileno-polioxipropileno, ampliando a gama de compostos eficientes em estimular a regeneração *in vitro* em diversas espécies vegetais e em cultivo de células animais. Davey et al. (2003) avaliaram esse surfactante em meios de cultivos utilizando biorreatores na organogênese *in vitro* de epicótilos e cotilédones de *Citrus* spp. Esse surfactante também foi empregado em células embriogênicas de *Oryza sativa* em suspensão submetidas à criopreservação (Anthony et al., 1996), na micropropagação de *Populus* spp. (Jordan-Costache et al., 1995) e em protoplastos de *Petunia hybrida* (Anthony et al., 1994).

Apesar dos seus benefícios, o Pluronic[®] F-68 tem o potencial de retardar o crescimento celular. Esse composto apresenta uma ligeira toxicidade para algumas linhagens de células de mamíferos (Sowana et al., 2002). Zhang et al. (1992) observaram redução de 17% no total do número de células de hibridoma cultivadas em meio suplementado com Pluronic[®] F-68. Essa taxa de crescimento reduzida pode ser conseqüência de alterações na membrana celular com conseqüente redução nas taxas do metabolismo celular.

No entanto, ao contrário de células de mamíferos, culturas de células vegetais apresentam maior tolerância ao Pluronic® F-68 (King et al., 1990; Kumar et al., 1992). Baixos níveis do surfactante Pluronic® F-68 suplementados ao meio de cultura estimularam o crescimento de células de *Petunia* e *Morinda citrifolia* (Anthony et al., 1994; Bassetti et al., 1995). O Pluronic® F-68 também promove o crescimento em muitas células vegetais, melhorando a absorção nutrientes e alterando algumas funções celulares (Trinh et al., 1994; Tomas et al., 1998). Além disso, tem sido sugerido que danos mecânicos nas células pode ser atenuados pela presença de Pluronic® F-68 (Trinh et al., 1994).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do surfactante não-iônico Pluronic® F-68 ao meio de cultura base, quanto à indução de regeneração de brotações *in vitro* em explantes hipocotiledonares de maracujazeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal

Para a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener foram utilizadas sementes da população FB-100 Maguary, cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG). Para a espécie *Passiflora cincinnata* Masters foram utilizadas como fontes de explantes, sementes maduras obtidas de frutos oriundos de pomar de polinização aberta e fornecidos pelo Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. A extração das sementes deu-se de acordo com o protocolo proposto por Tsuboi e Nakagawa (1992).

Após a extração manual do suco, as sementes foram postas para fermentar em sua própria polpa, em recipiente plástico e à temperatura ambiente, por um período de três dias. Em seguida, as sementes foram friccionadas com areia lavada até que toda mucilagem do arilo fosse retirada e postas para secar à sombra, em ambiente de laboratório, por três dias. Foram utilizadas para a germinação e obtenção dos explantes utilizados nos experimentos de regeneração contendo diferentes antibióticos.

3.2 - Germinação das sementes in vitro e obtenção dos explantes

Previamente ao processo de desinfestação das sementes, essas tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa, segundo técnica proposta por Reis (2001). Sob condições assépticas, a desinfestação consistiu da imersão inicial das sementes em álcool 70% (v/v) por 30 s, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5% (v/v) (Super Globo[®], Brasil) mais Tween 20 a 0,1 % (v/v), por um período de 10 min. Após esse período, foram realizados quatro enxágües com água deionizada e autoclavada.

As sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 ml de capacidade), contendo 30 ml de meio de cultura e 12 sementes por frasco. A composição do meio de cultura consistiu de sais MS (Murashige & Skoog, 1962) à metade de sua concentração, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®]

(Sigma Chemical Company, USA), com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, sendo autoclavado a 120°C , 1,1 atm por 20 min.

A germinação deu-se no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As plantas permaneceram nessa condição por quinze dias adicionais.

3.3 - Suplementação do Pluronic® F-68 na organogênese em hipocótilos

Os hipocótilos oriundos das plântulas das espécies *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata* foram segmentados em aproximadamente 1,0 cm de comprimento e dispostos horizontalmente em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm, J. Prolab, Brasil) contendo 25 mL meio de indução. Este consistiu de meio de cultivo MS acrescido de 3 % de sacarose, vitaminas B5, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 0,25 % (p/v) Phytigel® e o regulador de crescimento 6- bezilaminopurina (6-BA; Sigma Chem. Co., USA) a $2,35 \mu\text{M}$, sendo o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, anterior à autoclavagem (121°C , 1,1 atm por 15 minutos).

A regeneração e indução de brotos nos hipocótilos de maracujá foi obtida a partir da suplementação ao meio base, das concentrações 0,001; 0,01; 0,1 ou 0,5 % (p/v) do surfactante não-iônico de nome comercial Pluronic® F-68 (Sigma Chemical Company, USA). Os meios sem a adição de Pluronic® F-68 foram utilizados como controle.

Decorridos 30 dias da introdução do material, o experimento foi avaliado calculando-se o número total de brotos emitidos, a porcentagem do número de hipocótilos (frequência dos explantes) que responderam com brotações. O experimento foi repetido duas vezes em delineamento casualizado com 5 repetições por tratamento (10 explantes por placa de Petri).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Passiflora cincinnata apresentou maior número de brotações adventícias em relação a *P. edulis* f. *flavicarpa*, tanto em relação ao controle, como quando foram adicionadas diferentes concentrações do surfactante Pluronic® F-68 (Tabela 1). Houve resposta morfogênica dos explantes aos 20 dias de cultivo com regeneração das brotações adventícias em *P. cincinnata*. Para *P. edulis* f. *flavicarpa* foi observado resposta similar em explantes aos 30 dias de cultivo.

As melhores respostas quanto ao número de brotações adventícias ocorreu em presença de doses baixas (0,001 e 0,01 %) do surfactante, em ambas as espécies. Porém, em *P. edulis* f. *flavicarpa* os genótipos 'FB 200' e 'FB 300' apresentaram melhores respostas nas concentrações de 0,01 e 0,1 %. O surfactante Pluronic®F-68 favorece a fisiologia celular devido a sua capacidade de se ligar fortemente a superfície celular, evitando, assim, que ocorra o rompimento celular (Cho et al., 2007).

Khatun et al. (2003), avaliando a influência do Pluronic® F-68, relataram estímulo ao crescimento e aumento da eficiência da regeneração de brotações adventícias em *Hibiscus cannabinus* L., nas concentrações de 0,001 e 0,01 %.

Tabela 1: Número total de brotações adventícias em explantes hipocotiledonares de *Passiflora cincinnata* (PC) e *P. edulis* f. *flavicarpa* genótipos FB 100, FB 200 e FB 300 induzidos em MS suplementado com 6-BA 2,35 µM nas concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 0,5 % de Pluronic® F-68

Genótipo	Número de brotações Pluronic® F-68 (%)				
	0	0,001	0,01	0,1	0,5
PC	36,00Ba	54,40Aa	54,60Aa	37,60Ba	48,40Aa
FB 100	13,00Bc	12,40Bb	23,80Abc	13,40Bc	12,00Bb
FB 200	14,40Bbc	16,20ABb	25,80ABbc	24ABbc	19,60ABb
FB 300	10,20Bbc	17,80ABb	15,40Abc	20,80ABbc	19,20ABb

Médias seguidas por pelo menos uma letra maiúscula, nas linhas, e uma letra maiúscula, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Sowana et al. (2002) observaram que o meio de cultivo suplementado com elevada concentração do Pluronic® F-68 promoveu incrementos na

regeneração de células em suspensão de cenoura silvestre, em decorrência da de possíveis interações entre o surfactante e as membranas celulares. Em cultivo de células em suspensão de duas cultivares de arroz (*Oryza sativa* cv. *Tarom* e *Lolium*), Lynch et al. (1994) relataram aumento no crescimento celular das mesmas, em função da suplementação do Pluronic® F-68 ao meio de cultivo.

Khehra et al. (1995) estudando *Chrysanthemum morifolium* observaram que em concentrações ótimas do surfactante Pluronic® F-68 adicionado ao meio de cultivo estimulou a regeneração de brotações adventícias em explantes foliares. O efeito do Pluronic® F-68 promovendo o crescimento em diferentes órgãos e tecidos responsivos tem sido observado em *Solanum dulcamara* (Kumar et al., 1992), *Corchorus capsularis* (Khatum et al., 1996), *Hypericum perforatum* (Brutovská et al., 1994), e em *Populus* spp. (Iordan-Costache et al., 1995).

O efeito do Pluronic® F-68 em meio de cultura para as Passifloraceae ocorre variação de resposta interespecífica entre os explantes utilizados em relação à adição do surfactante. Entretanto, para *P. giberti*, quando os explantes foram expostos a 0,001% do surfactante houve o aumento tanto na massa fresca quanto na massa seca e maior percentagem de regeneração de brotações. Em contrapartida, para *P. mollissima* ocorreu o máximo de número de regeneração de brotações por explante quando adicionou-se 0,1% do surfactante, destacando a variação genotípica das plantas quanto a resposta à adição do Pluronic® F-68 ao meio de cultivo (Davey et al., 2003; GILL et al., 2003).

Em *Solanum dulcamara* (Kumar et al., 1992) e em *Dendrothema grandiflora* baixas concentrações (0,001 e 0,1%) de Pluronic® F-68 estimula o crescimento e a diferenciação de explantes radiculares e foliares transformados com *Agrobacterium*. Também pode-se destacar a importância do Pluronic® F-68 adicionado ao meio de cultivo estimulando o crescimento *in vitro* de explantes nodais para espécies arbóreas tropicais como em mandioca (*Manihot esculenta*) (Konan et al., 1997).

Estudos relatam que o efeito do Pluronic® F-68 está envolvido em interações com a membrana celular, promovendo interações na regeneração de epicótilos e cotilédones de *Citrus* e na regeneração de segmentos foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. giberti* e *P. mollissima*. As respostas das

plantas quando o surfactante Pluronic[®] F-68 é adicionado ao meio de cultivo depende não só da concentração como também da fonte do explante e genótipo (Lowe et al., 1993). Conforme os dados e relatos na literatura que a suplementação do surfactante Pluronic[®] F-68 em meio de cultura proporciona melhoria na resposta morfogênica dos explantes, devido a sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática, aumentando conseqüentemente a capacidade de absorção de nutrientes, de reguladores de crescimento e outras substâncias adicionadas ao meio (Lowe et al., 1993).

Em conclusão, o presente estudo mostra que para as espécies *P. cincinnata* Mast. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., a suplementação do meio de cultura com o surfactante Pluronic[®] F-68 em baixas concentrações (0,001 a 0,01%) melhora as respostas morfogênicas *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, P.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; WASHINGTON, C.; LOWE, K.C. Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68. **Plant Cell Reports**, 13:251-255, 1994.
- ANTHONY, P.; JELODAR, N.B.; LOWE, K.C.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells. **Cryobiology**, 33:508-514, 1996.
- BASSETTI, L.; HAGENDOORN, M.; TRAMPER, J. Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension culture of *Morinda citrifolia*. **Journal of Biotechnology**, 39: 149-155, 1995.
- BRUTOVSKA, R.; CELLAROVA, E.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Stimulation of multiple shoot regeneration from seedling leaves of *Hypericum perforatum* L. by Pluronic F-68. **Acta Biotechnologica**, 144:371-377, 1994.
- CHOO, D. Y.; LEE, J. M.; OH, S. J.; HOVOUNG JANG; KIM, J. Y.; PARK, J. H.; TANAKA, A. Influence of oxygen vacancies on the electronic structure of HfO₂ films. **PHYSICAL REVIEW B** 76, 165411: 1-5, 2007.
- DAVEY, M.R.; CANCINO, G.O.; GILL, M.I.S.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Micropropagation of tropical fruits: Beneficial effects of non-ionic surfactants. **Acta Horticulturae**, 616: 353-358, 2003.
- FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de passiflora. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, p.187-2000, 1991.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158, 1968.
- GEORGE, E.F; HALL, A. M.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd Edition, 504 p. 2008.
- GILL, M. I. S.; CANCINO, G. O.; ANTHONY, P.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Pluronic F-68 enhanced shoot regeneration in micropropagated *Citrus* rootstock and *Passiflora* species. **Acta Biotechnologica**, v.23, p. 349-358, 2003.
- IORDAN-COSTACHE, M.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Improved micropropagation of *Populus* spp. by Pluronic F-68. **Plant Growth Regulation**, 17:233-239, 1995.
- KHATUN, A.; LAOUAR, L.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; MULLIGAN, B.J.; LOWE, K.C. Effects of Pluronic F-68 on shoot regeneration from cultured jute cotyledons and on growth of transformed roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34:133-140, 1993.
- KHATUN, A.; NAHER, Z.; MAHBOOB, S.; SAHA, C.K.; BILKIS, S. An efficient protocol for plant regeneration the cotyledons of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **Biotechnology**, 2:86-93, 2003.

KHEHRA, M.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. An improved micropropagation system for *Chrysanthemum* based on Pluronic F-68-supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 41:87-90, 1995.

KING, A. T.; DAVEY, M. R.; MULLIGAN, B.J.; LOWE, K. C. Effects of Pluronic F-68 on plant cells in suspension culture. **Biotechnology Letters**, 12:29-32, 1990.

KONAN, N. K.; SCHÔPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, 16: 444–449, 1997.

KUMAR, V.; LAOUAR, L.; DAVEY, M. R.; MULLIGAN, B. J.; LOWE, K. C. Pluronic F-68 stimulates growth of *Solanum dulcamara* in culture. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.487-493, 1992.

LYNCH, P.T.; BENSON, E. E.; JONES, L.; COCKING, E. C.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Rice cell cryopreservation: The influence of culture methods and embryogenic potential of cell suspensions on post-thaw recovery. **Plant Science**, 98: 185-192, 1994.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 158-159, 2002.

MELETTI, L. M. M. Caracterização agrônômica de progênies de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener) Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.. 82, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p.361-383.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Viçosa, UFV. 90 p. 2001.

SOWANA, D.D.; WILLIAMS, D.R.G.; O'NEILL, B.K.; DUNLOP, E.H. Studies of the shear protective effects of Pluronic F-68 on wild carrot cell cultures. **Biochemical Engineering Journal**, 12:165-173, 2002.

THOMAS, C. R.; ZHANG, Z. The effect of hydrodynamics on biological materials. In: Galindo E, Ramírez OT, editors. Advances in Bioprocess Engineering II. **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 137–71, 1998.

TRINH, K.; GARCIA-BRIONES, M.; HINK, F.; CHAMERS, J. J. Quantification of damage to suspended insect cell as a result of bubble rupture. **Biotechnol Bioeng** 43:37– 45, 1994.

VIEIRA, M.L. C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. CABI Publishing, Oxfordshire. pp. 436-453, 2004.

VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; MATTA, F.P.; PÁDUA, J.G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.1-453, 2005.

ZERBINI, F.M.; NASCIMENTO, A.V.S.; ALFENAS, P.F.; TORRES, L.B.; BRAZ, A.S.K.; SANTANA, E.N.; OTONI, W.C.; CARVALHO, M.G. Transformação genética do maracujazeiro para resistência a doenças. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (eds.) **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. EMBRAPA, Planaltina, pp. 589-597, 2005.

ZERBINI, F.M.; OTONI, W.C.; VIEIRA, M.L.C. Passionfruit. In: Kole, C.R. & Hall, T. (eds.) **Compendium of Transgenic Crop Plants, Transgenic Series, v.5, Tropical and Subtropical Fruit and Nuts**, p. 212-233, 2008.

CONCLUSÃO GERAL

As vedações favoreceram o crescimento *in vitro* de *P. cincinnata* e de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo recomendados no estabelecimento *in vitro* dessas espécies.

As respostas dos genótipos estudados ocorrem em épocas diferente sendo um processo assincrônico no qual a suplementação do regulador de crescimento BA ao meio de cultivo é indispensável para a resposta organogênica de explantes radiculares. Brotações alongadas em meio líquido sob agitação foram enraizadas em substrato fibra de coco, e aclimatizadas com sucesso.

A citometria de fluxo indicou que não houve variação na quantidade de DNA dos regenerantes aclimatizados de todos os genótipos.

O diagnóstico de PCR confirmou a presença do T-DNA e Ri-TDNA em todos os transformantes da espécie *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis*.

A transformação genética mostra-se promissor para o estudo de genes com funções desconhecidas, assim como também, o estudo dos genes envolvidos na via da arquitetura floral, e também a facilidade de manipulação das raízes “hairy root” e a possibilidade de regeneração adventícia de brotações e de plantas transformadas.

A adição de Pluronic[®] F-68 foi eficiente para a indução de brotações adventícias nos explantes dos genótipos de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, podendo ser utilizado para melhorar a regeneração dos explantes *in vitro*.