

DELCIO DE CASTRO FELISMINO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DA
RESPOSTA MORFOGÊNICA *IN VITRO* DE
SEGMENTOS HIPOCOTILEDONARES DE
MARACUJAZEIRO INFLUENCIADA PELA
POSIÇÃO, ORIENTAÇÃO E POLARIDADE**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para a obtenção do
título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2005

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

T

F315a
2005

Felismino, Delcio de Castro, 1958-

Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade / Delcio de Castro Felismino. – Viçosa : UFV, 2005.

xi, 112f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Maria Moreira Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Passiflora edulis* - Morfologia. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 3. *Passiflora edulis* - Propagação *in vitro*. 4. *Passiflora edulis* - Anatomia.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.42523

DELCIO DE CASTRO FELISMINO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DA
RESPOSTA MORFOGÊNICA *IN VITRO* DE
SEGMENTOS HIPOCOTILEDONARES DE
MARACUJAZEIRO INFLUENCIADA PELA
POSIÇÃO, ORIENTAÇÃO E POLARIDADE**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, para a
obtenção do título de “Doctor
Scientiae”.

APROVADO: 27 de setembro de 2005

Prof.^a Renata Maria Strozi Meira
(Conselheira)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

Prof. Sílvio Lopes Teixeira

Prof. José Maria Moreira Dias
(Orientador)

Dedicatória

Com amor, dedico à minha família

AGRADECIMENTO

Ao amor e misericórdia de Deus Pai, Nossa Senhora Virgem dos Pobres, Santa Rita de Cássia e Divino Espírito Santo que conhecemos e Neles cremos, sem os quais não seria possível concluirmos este trabalho.

À Universidade Estadual da Paraíba, que reconheceu a necessidade premente de seu corpo docente, permitindo-nos concluir nossos estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, que com muito zelo nos acolheu e muito contribuiu para nossa formação intelectual e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PICDT), pela concessão da bolsa de estudo.

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

Ao meu orientador, Prof^o. José Maria Moreira Dias, pela orientação, apoio, confiança, conselhos, críticas, sugestões e amizade ao longo do curso, pelo incentivo incessante e, acima de tudo, por acreditar que nós podemos fazer melhor.

Aos Prof^{tes} Wagner Otoni, Renata Meira, Sérgio Motoike e Sílvio Teixeira, pelos conselhos, orientações, sugestões, apoio, amizade, incentivo, e por acreditar que nós podemos fazer melhor.

Ao pesquisador Wellington Santos (EMBRAPA/CNPA, Campina Grande, PB), nas análises estatísticas, pelos conselhos, orientações, sugestões, apoio, amizade e incentivo.

Aos Prof^{tes} da UFV, aqui representados por Claudio Bruckner; Dalmo Siqueira; Luiz Salomão do DFT, e Aristéa Azevedo; Luzimar Silva; Marília Ventrella do DBV, pelos conselhos, apoio, amizade e incentivo.

Aos meus pais Delfino Felismino e Cenira Felismino, que com seu amor angelical, souberam educar, pelos empreendedores que são, por que investiram sem ter a certeza de que colheriam bons frutos.

À Sra. Inês Dias e os filhos Gustavo e Leandro Dias, pelo apoio, incentivo, carinho e, amizade materna e fraterna que tive durante minha estada nesta cidade.

Aos amigos, aqui representados por Rodrigo Sobreira Alexandre, Gizella Machado, Virginia Carvalho, Gustavo Nogueira, Reginaldo Mafía, Marcela Thadeo, Evander Ferreira, amigos técnicos e funcionários, aqui representados por Márcio

Rocha, Mara Rodrigues, Cenira Silva do DFT, e Vânia Ferreira, Ilza Neves do DBV, pelo apoio, amizade, incentivo, que de modo simples muito contribuíram na condução dos experimentos, pelo bom trato e amizade de irmãos que tive durante minha estada nesta Universidade.

Enfim, a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DELCIO DE CASTRO FELISMINO, filho de Delfino José Felismino e Cenira de Castro Felismino, nasceu em 10 de fevereiro de 1958, na cidade de Limoeiro, Pernambuco.

Em dezembro de 1981, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade católica de Pernambuco (UNICAPE), Recife, Pernambuco.

Em 1992, passou a compor o quadro de docentes do Departamento de Biologia, da Universidade Estadual da Paraíba.

Em 1995, especializou-se em Educação Ambiental.

Em dezembro de 1997, concluiu o curso de mestrado em Fitotecnia, pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, Paraíba.

Em agosto de 2000, iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

CONTEÚDO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
 CAPÍTULO 1.....	 27
Influência da polaridade na resposta morfogênica de segmentos hipoclotiledonares de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. em meios de cultura contendo TDZ e BAP	
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1. Material vegetal.....	31
2. Condições de cultivo.....	32
3. Análise morfológica.....	33
4. Análise estatística.....	33
RESULTADOS.....	33
1. Análise descritiva da resposta morfogênica em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro.....	33
1.1. Em meio de cultura com ausência de citocinina (controle).....	33
1.1.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo.....	33
1.1.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo.....	34
1.2. Em meio de cultura contendo BAP (0,7 mg L ⁻¹).....	36
1.2.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo.....	36
1.2.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo.....	37
1.3. Em meio de cultura contendo TDZ (1,0 mg L ⁻¹).....	39
1.3.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo.....	39
1.3.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo.....	41

1.4. Influência da posição de retirada dos segmentos ao longo do eixo hipocotiledonar.....	42
2. Análise estatística da resposta morfogênica em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro.....	46
2.1. Respostas morfogênicas no extremo distal dos segmentos hipocotiledonares.....	46
2.2. Respostas morfogênicas no extremo proximal dos segmentos hipocotiledonares.....	49
DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
 CAPÍTULO 2.....	 62
Influência da polaridade, da posição de extração de segmentos no hipocótilo e da orientação destes explantes no meio de cultura sobre o mecanismo de ação do TDZ e BAP na morfogênese <i>in vitro</i> do maracujazeiro	
RESUMO.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
1. Material vegetal.....	66
2. Condições de cultivo.....	67
3. Análise morfológica.....	68
4. Análise histológica.....	68
5. Delineamento experimental.....	69
RESULTADOS.....	69
1. Análise morfológica.....	69
1.1. Influência da orientação do explante na resposta morfogênica.....	69
1.2. Influência da aplicação de reguladores de crescimento na resposta morfogênica.....	70
1.3. Influência da posição do explante no eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica.....	71
1.4. Análise histológica.....	71
1.5. Influência da posição do explante ao longo do eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica.....	73
DISCUSSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

CAPÍTULO 3.....	87
O potencial do TDZ na indução da morfogênese em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i> Sims. f. <i>flavicarpa</i> Deg.)	
RESUMO.....	88
INTRODUÇÃO.....	89
MATERIAL E MÉTODOS.....	91
1. Material vegetal.....	91
2. Condições de cultivo.....	91
3. Análise morfológica.....	92
4. Análise histológica.....	92
5. Delineamento experimental.....	93
RESULTADOS.....	94
1. Análise morfológica.....	94
2. Influência da posição do explante no eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica.....	94
3. Análise histológica.....	95
DISCUSSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
CONCLUSÕES GERAIS.....	110

RESUMO

FELISMINO, Delcio de Castro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2005. **Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade.** Orientador: José Maria Moreira Dias. Conselheiros: Renata Maria Strozi Alves Meira e Wagner Campos Otoni.

Atualmente, o TDZ é conhecido como indutor morfogênico, atuando como um substituto de auxinas e citocininas, na embriogênese e organogênese em várias espécies. Com base no exposto, foram realizados estudos com explantes hipocotiledonares cultivados em meio com adição de TDZ e BAP, e sem combinação entre os mesmos. Na primeira e segunda fases, avaliou-se a influência da posição do explante, da polaridade fisiológica e da orientação dos explantes no meio de cultura. Na terceira fase, avaliou-se o potencial do TDZ, como indutor da embriogênese em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro. No final dos estudos, constatou-se que a resposta morfogênica e a rota morfogênica em segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro são dependentes da presença e da natureza química das citocininas adicionadas ao meio de cultura em interação com o modo pelo qual o explante é inserido no meio de cultura; a polaridade fisiológica que se estabelece nos extremos dos segmentos hipocotiledonares, bem como a magnitude desta polaridade, pode ser alterada pela natureza química da citocinina, aplicada ao meio de cultivo, e pela orientação do explante nesses meios. Na presença do TDZ, a polaridade não se estabeleceu; não houve gradiente de resposta morfogênica entre os segmentos. Segmentos hipocotiledonares podem ser induzidos à formação de uma massa de células semelhantes à proembriões e estruturas organogênicas sob influência do TDZ, sendo estas rotas morfogênicas dependentes da concentração deste fitorregulador.

ABSTRACT

FELISMINO, Delcio de Castro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2005. **Morphologic and histochemical evaluation of in vitro morphogenic response of hypocotyledonary segment of passion fruit influenced by position, orientation and polarity.** Adviser: José Maria Moreira Dias. Committee members: Renata Maria Strozi Alves Meira e Wagner Campos Otoni.

TDZ is known morphogenic inductor acting as auxin and cytokinin on embryogenesis and organogenesis of several species. Based in this statement, several studies were conducted with passion fruit hypocotyledonary explants, cultivated in a medium with TDZ and BAP without combinations. In the first and the second phase of studies the influence of explant position, physiological polarity and explant orientation were studied. In the third phase of studies the TDZ potentiality as somatic embryogenesis inductor in passionfruit hypocotyledonary segments were studied. Finally, it was observed that the morphogenic response and the morphogenic rate in passion fruit hypocotyledonary segments are dependent on the presence and the chemical nature of the cytokinin in the interaction with position, polarity and orientation of the explant. In the presence of TDZ, the polarity did not establish. There have no gradient of morphogenic response among segments. Under the influence of TDZ and depending on the dose of the same the segment can be induced to form cell masses similar to proembryogenic masses or organogenic structures.

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo Kantharajah e Dodd (1990), Grattapaglia et al. (1991) e Vaz (1991), a biotecnologia poderá contribuir na melhoria da cultura do maracujazeiro, por possibilitar a obtenção de variedades e cultivares com características superiores, em um espaço de tempo bem inferior àquele demandado pelos métodos clássicos de fitomelhoramento. Disponibilizando assim, plantas superiores e compatíveis com as necessidades do mercado.

Nos últimos anos, têm sido realizados numerosos trabalhos de cultura de células e tecidos vegetais em distintas espécies do gênero *Passiflora* (Nakayama, 1966; Moran Robles, 1978, 1979; Scorza e Janick, 1980; Baccarin, 1988; Kantharajah e Dodd, 1990; Drew, 1991; Dornelas e Vieira, 1993; d'Utra Vaz et al., 1993; Biricolti e Chiari, 1994; Manders et al., 1994; Dornelas et al., 1995; Kawata et al., 1995; Otoni et al., 1995a, b; Mohamed et al., 1996; Faria e Segura, 1997; Biasi et al., 2000; Hall et al., 2000; Alexandre, 2002; Couceiro, 2002).

Os dados dos trabalhos revelam que o êxito dos cultivos *in vitro* não só depende dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos: genótipo, idade fisiológica, estágio de desenvolvimento e vigor do material de partida; órgão de procedência do explante; posição do órgão na planta, do qual se extrai o explante; orientação do explante no meio de cultura), mas também das condições ambientais da sala de incubação (temperatura, luz e umidade relativa) e do meio de cultura (composição mineral e orgânica). Não obstante, ainda pouco se conhece sobre a resposta morfogênica do maracujazeiro *in vitro* com relação ao tipo, orientação e polaridade do explante, no referente à formação de calos, gemas e brotos, quando se utilizam diferentes citocininas no meio de cultura.

Ao se comparar trabalhos com diferentes espécies de *Passiflora* (Nakayama, 1966; Moran Robles, 1978, 1979; Scorza e Janick, 1980; Baccarin, 1988; Manders et al., 1994; Kawata et al., 1995; Becerra et al., 2004), utilizando-se explantes de diferentes idades fisiológicas, verifica-se que a capacidade morfogênica do material juvenil é mais elevada que o de explantes com maior idade. Segundo Pereira et al. (2000) e Becerra et al. (2004), essa propriedade do tecido juvenil está relacionada a sua maior atividade meristemática.

Nos trabalhos revisados (Baccarin, 1988; Rêgo, 2001; Couceiro, 2002; Reis, 2003), segmentos de hipocótilo foram usados como explantes, seja para organogênese direta, seja indireta. Segundo Couceiro (2002), a utilização de plântulas germinadas *in vitro* como fonte de segmentos de hipocótilo é bastante promissora, uma vez que a contaminação é eliminada ao se desinfestar as sementes, produzindo plântulas axênicas. Ao se utilizar plântulas provenientes de sementes, como fonte de explantes, pode-se lograr altas taxas de respostas morfogênicas nos cultivos *in vitro*.

Em maracujazeiro, tão somente a adição de uma citocinina ao meio de cultura, tem sido suficiente para promover a resposta morfogênica esperada, com vistas à formação de estruturas (Moran Robles, 1978; Kantharajah e Dodd, 1990; Dornelas e Vieira, 1994; Kawata et al., 1995; Faria e Segura, 1997; Couceiro, 2002). A explicação para este fato pode estar embasada no balanço entre auxinas e citocininas, onde, provavelmente, a quantidade de auxina endógena seja suficiente para estabelecer uma relação entre ambos fitorreguladores favorável ao processo (Weaver, 1972; Davies 1987).

Ao revisar estes trabalhos, pode-se observar que no cultivo *in vitro* do maracujazeiro, o BAP tem sido a citocinina mais utilizada. Sua concentração é o fator que mais tem influenciado as respostas dos processos morfogênicos. Biasi et al. (2000) e Couceiro (2002), ao estudarem a indução de organogênese em segmentos internodais, nodais e regiões hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, obtiveram formação de calos e partes aéreas nas extremidades dos explantes em meios contendo BAP. Porém, concentrações superiores a 1,0 mg L⁻¹ (Couceiro, 2002) ou a 2,0 mg L⁻¹ (Biasi et al., 2000), apesar de eficientes para indução de gemas, foram prejudiciais à brotação das mesmas. Outras citocininas têm sido usadas, como a cinetina e zeatina. A adição de cinetina aos meios de cultivo foi mencionada eficaz para incrementar a organogênese (Nakayama, 1966; Moran Robles, 1978; Scorza e Janick, 1980).

As respostas morfogênicas de células e tecidos vegetais *in vitro* podem ser avaliadas e caracterizadas pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos histológicos podem ser realizados para verificação e confirmação da rota de resposta morfogênica, diferenciando-se organogênese de embriogênese somática. Caracterizada a rota, é possível estabelecer estratégias de cultivo que permitam

lograr protocolos eficientes para indução e obtenção de plantas. Cortes histológicos, além de permitir observar se a formação de gemas adventícias ou de embriões somáticos ocorre de forma direta ou indireta, permitem, também, caracterizar as alterações celulares e a atividade de organelas durante os processos, possibilitando identificar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos (Monteiro-Hara, 2000; Lombardi, 2003).

Saravitz et al. (1993), ao utilizarem como fitorreguladores BAP e ANA, na indução de gemas adventícias em *Abies fraseri*, observaram alterações celulares ocorridas em cotilédones e hipocótilo. Com base na análise dos cortes seriados, os autores sugerem que os cotilédones de *Abies fraseri* não apresentaram células competentes para formação de gemas adventícias, quando cultivadas com BAP e ANA. Entretanto, a organogênese foi observada nos explantes de hipocótilo, após 4 semanas de cultivo. As divisões celulares foram observadas nas camadas epidérmicas e subepidérmicas do explante.

A literatura revisada evidencia que os estudos sobre morfogênese *in vitro* do maracujazeiro têm centrado particular atenção na influência de fatores genéticos, tipos de explante e meios de cultivo. Neste último quesito, ênfase especial tem sido dada às concentrações de ANA (ácido α -naftaleno-acético) e BAP, adicionados ao meio, sendo escassos os trabalhos que utilizam reguladores de crescimento menos habituais, como, por exemplo, o TDZ. Escassos, também, têm sido os estudos sobre a histologia dos diferentes tipos de explantes de maracujazeiro cultivados *in vitro*, fato agravado pelo não relacionamento interativo da histologia com outros fatores que afetam a resposta morfogênica *in vitro*, como, composição do meio de cultura, orientação dos explantes no meio de cultura e posição do órgão da planta de onde se extrai o explante.

Há que ressaltar, ainda, que muitas conclusões de trabalhos sobre morfogênese *in vitro* têm se baseado em análises morfológicas, o que pode redundar em imprecisão das informações. Estudos histológicos são importantes para a confirmação da rota morfogênica adotada, bem como para a determinação de tipos celulares dos quais estruturas vegetais são originadas.

REVISÃO DE LITERATURA

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae. Diferentes autores consideram como doze (Dornelas e Vieira, 1993; Joly, 1993; Barbosa e Vieira, 1997) ou quatorze (Leitão Filho e Aranha, 1974; Manica, 1981) o número de gêneros, os quais, por sua vez, englobariam de trezentas e cinquenta (Fouqué, 1972), quatrocentas (Lopes, 1991, 1994; Barbosa e Vieira, 1997), e até mesmo quinhentas e oitenta espécies (Leitão Filho e Aranha, 1974; Freitas, 1987; Oliveira et al., 1987; Oliveira e Ferreira, 1991; Kawata et al., 1995; Otoni et al., 1995a; Morton, 2000). Pelo menos dois desses gêneros encontram-se distribuídos no Brasil: *Dilkea* e *Passiflora* (Lopes, 1991, 1994). Este último é o mais representativo e importante e encerra, aproximadamente, 350 espécies, as quais estão amplamente disseminadas nas regiões tropicais da América do Sul (Leitão Filho e Aranha, 1974; Manica, 1981; Freitas, 1987; Oliveira et al., 1987; Ferreira e Oliveira, 1991; Morton, 2000).

Passiflora edulis Sims. f. *flavicarpa* Deg. (maracujazeiro-amarelo, peroba, do norte), é uma planta trepadora, semilenhosa, perenifólia, folhas trilobadas, caule cilíndrico ou ligeiramente angular, quando jovem; e com grande vigor vegetativo. Seus ramos podem atingir distâncias entre 10 a 20 m. As fases juvenil e adulta são bastante curtas, de modo que a colheita dos frutos se inicia 5 a 9 meses após a semeadura. Apesar de normalmente perene, em condições de cultivos comerciais, tem a longevidade reduzida para 3 a 6 anos (Manica, 1981; Morton, 2000). As flores são hermafroditas e necessitam de polinização cruzada para a frutificação (Bruckner et al., 1995; Appezzato-da-Glória et al., 1999; Morton, 2000). O fruto é uma baga carnosa e de formato arredondado, com pericarpo duro (casca de cor esverdeada, quando imaturo, e de coloração amarelo brilhante, quando maduro), com muitas sementes aderidas ao funículo ovariano, formando uma polpa amarelada, aromática e succulenta (Purseglove, 1974).

A maior importância do maracujazeiro está associada às qualidades alimentícias de seus frutos (Manica, 1981; Morton, 2000; Lorenzi e Matos, 2002). Estes são apreciados pelo seu aroma e sabor, sendo comercializados sob as formas de produtos elaborados e *in natura*. Do fruto do maracujazeiro se extrai um dos mais apreciados sucos de fruta, que, na forma concentrada, resulta na maior importância econômica desta planta (Manica, 1981; Morton, 2000; Lorenzi e Matos, 2002).

Ainda do fruto, se elaboram doces, geléias e licores (Morton, 2000; Lorenzi e Matos, 2002). Outro produto que pode ser obtido a partir do fruto de maracujá é a pectina, que se encontra na parte branca da casca, em proporção que podem alcançar 2 % (Souza e Sandi, 2001). Ademais disso, segundo Manica (1981) e Morton (2000) o maracujá constitui numa importante fonte de carboidratos, vitaminas do grupo A, C e do complexo B e sais minerais: cálcio, fósforo e ferro. Outra importância desta fruteira se relaciona às propriedades farmacológicas (analgésicos, antiinflamatórios, depurativos, sedativos e vermífugos), razão pela qual esta planta está incluída na monografia da Farmacopéia Brasileira (Teske e Trentini, 1995; Lorenzi e Matos, 2002) e ao valor decorativo de suas flores (Ferreira e Oliveira, 1991).

O Brasil é um importante produtor mundial de maracujá amarelo, apresentando condições edafoclimáticas adequadas ao seu cultivo (Ruggiero et al., 1996; Aguiar e Santos, 2001).

O maracujazeiro-amarelo é uma planta alógama, em virtude principalmente, da morfologia floral e por possuir grãos de pólen pesados e pegajosos, o que dificulta a polinização anemófila. Essa alogamia é agravada pela auto-incompatibilidade do tipo homomórfica e esporofítica (Bruckner et al., 1995), embora seja possível encontrar plantas autocompatíveis (Menzel et al., 1989). Além disso, as flores do maracujazeiro têm um colorido atraente, são vistosas, aromáticas e com abundância de néctar, causando forte atração aos polinizadores. Tal fato favorece a polinização cruzada, principalmente por insetos (Silva e São José, 1994; Hoffmann, 1997), acarretando, portanto, alta taxa de segregação gênica, o que redundará em uma população de plantas genotipicamente heterogênea, fato que, segundo Ruggiero (1991), Bruckner (1994) e Lima et al. (1999), acentua, ainda mais, o problema da auto-incompatibilidade, além da desuniformidade cultural.

As espécies de maracujazeiro são todas monoembriônicas, sendo as plantas juvenis de origem zigótica. Para a produção de mudas desta planta, se emprega, comumente, a via seminífera (Manica, 1981; Ruggiero, 1987), razão pela qual é quase impossível obter plantas ou populações homogêneas de plantas, a partir de sementes. Esta homogeneidade somente pode ser alcançada mediante a propagação vegetativa (Kantharajah e Dodd, 1990; Monteiro et al., 2000).

A cultura de células e tecidos vegetais pode constituir um método eficiente na produção de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária. Essa técnica vem

sendo utilizada com êxito para a obtenção de mudas, com esse padrão, em grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação (Paiva, 1998). Por outra parte, a utilização desta técnica constitui-se numa importante ferramenta para trabalhos de melhoramento genético, por apresentar grande potencialidade e estratégias para estudos de fenômenos citológicos, morfológicos e fisiológicos. A partir da última década, pode-se observar grandes avanços no desenvolvimento dos protocolos de propagação *in vitro*, decorrentes dos estudos realizados sobre cultura de calos e de células em suspensão, embriogênese somática, organogênese, isolamento e cultivo de protoplastos e obtenção de plantas transgênicas (Moura et al., 2001).

Sabe-se que a morfogênese é fundamentalmente o resultado da divisão e diferenciação celular organizada e com padrões definidos, eventos estes que dependem, basicamente, da atividade e expressão de certos genes. Assim, fatores que controlam ou afetam esses eventos são os responsáveis pela morfogênese. Tais fatores são variados e interagem de diversas formas, sendo quase que impossível caracterizar um único fator específico para cada fenômeno morfogenico. Os efeitos isolados ou sinérgicos desses fatores variam de acordo com as condições de cada tipo de célula, podendo ser mais ou menos definidos, de acordo com a espécie, variedade ou cultivar, tecido e órgão, e peculiar para uma dada condição fisiológica de momento (Reinert e Bajaj, 1977; Handro e Floh, 1990; Pierik, 1990).

Com relação ao material vegetal (explante), sabe-se que todas as células vegetais, teoricamente, são totipotentes, com capacidade intrínseca de formar uma planta completa. Isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de formar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (Kerbaudy, 1999).

A formação de calo é uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in vitro*. Por definição, calo é uma massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desordenada (desorganizada), isto é, de células parenquimáticas em vários estádios de lignificação (Handro e Floh, 1990). Normalmente se desenvolve na região basal do explante, através da proliferação de células na região do câmbio vascular (Handro e Floh, 1990; Hartman et al., 1990; Pierik, 1990; Kosky, 1998). Segundo Pierik (1990) e Kosky (1998), sua formação pode ser dividida basicamente em três estádios: indução, divisão e diferenciação. Tais estádios são caracterizados por alterações no tamanho celular, estrutura e condições metabólicas do tecido. A

subcultura de tecidos de calo pode repetir a seqüência mencionada (Reinert e Bajaj, 1977; Handro e Floh, 1990).

Em certos casos, a cultura *in vitro* não promove a formação de calos, mas apenas uma proliferação celular restrita às regiões injuriadas ou cortadas do explante, formando tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática. Tal atividade pode ocorrer, também, em regiões epidérmicas e subepidérmicas dos explantes (Handro e Floh, 1990; Pierik, 1990; Kosky, 1998). A partir da zona de atividade meristemática em tecidos de calo e, também, nos explantes primários, as divisões celulares e o padrão de diferenciação podem ocorrer, de modo a produzir um grau de organização morfo-anatômica peculiar, que no caso de caracterizar um órgão definido, constitui-se no processo denominado organogênese (Handro e Floh, 1990).

Segundo Reinert e Bajaj (1977), Handro e Floh (1990) e Kosky (1998), quando a organogênese ocorre diretamente a partir de tecidos do explante ou de pequena proliferação de células dos mesmos, ainda sobre o explante original, o processo se dará por organogênese direta, e quando ocorre a partir de células de tecidos calosos do explante primitivo, ou a partir de suspensões celulares e calos daí derivados, o processo se dará por via indireta.

Nos casos acima mencionados, a neoformação de órgãos decorre de processos de desdiferenciação, divisão celular e organização de novos meristemas ou zonas de atividade meristemática. Uma outra possibilidade é a utilização direta de tecidos meristemáticos, especialmente ápices caulinares e radiculares (Kerbaudy, 1984a, b, 1985; Kunieda e Kerbaudy, 1986; Kosky, 1998), onde ocorre grande homogeneidade, com as células estando sempre num processo ativo de divisão, o que facilita a indução dos processos organogenéticos (Handro e Floh, 1990).

A embriogênese somática é um caso particular de morfogênese, onde a partir de tecidos do explante ou de calo, organizam-se estruturas semelhantes aos embriões zigóticos. Tais estruturas se originam geralmente de uma célula ou pequeno grupo de células no calo, ou também diretamente a partir de camadas internas ou superficiais num explante. Assim, a embriogênese também pode ser um processo direto ou indireto (Reinert e Bajaj, 1977; Handro e Floh, 1990; Pierik, 1990). Segundos esses mesmos autores, há que se ter em conta que a embriogênese pode ocorrer, também, a

partir da cultura de células em suspensão, cultura esta que, inicialmente, pode dar origem a massas celulares (calos), ou diretamente embriões.

Quando a neoformação (direta ou indireta) de gemas adventícias resulta em brotações (eixos caulinares), estas ficam, em geral, firmemente conectadas aos tecidos de origem, não havendo a individualização de um ápice radicular. Para obtenção de uma nova planta, é necessário isolar-se o eixo caulinar e induzir o seu enraizamento, cultivando-o em outro meio de cultura específico para tal. Na embriogênese, as estruturas formadas têm organização nitidamente bipolar (pólos caulinar e radicular) e se destacam com facilidade da massa celular que as originaram. Em geral, é necessário o isolamento dos embriões e posterior cultivo dos mesmos em meios diferentes daquele que os induziu, para se lograr o desenvolvimento de uma nova planta (Reinert e Bajaj, 1977; Handro e Floh, 1990; Pierik, 1990).

Informações desse tipo têm aplicações diretas nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* e, conseqüentemente, otimizando as condições de cultivo para aquelas espécies que apresentam desvantagens ou dificuldades de clonagem pelos métodos convencionais, como o maracujazeiro. As informações morfogênicas ainda são úteis na determinação de qual é a melhor fase de crescimento ou desenvolvimento celular, que propicie uma maior produção de compostos celulares específicos (Serra, 1999).

Pesquisas com calos formados a partir de tecidos caulinares, foliares e radiculares são realizadas, principalmente para determinarem as condições de cultivo que os explantes requerem para sobreviver e crescer (Siqueira e Inoue, 1992) e também, para estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes dos metabolismos primário e secundário, obter suspensão celular e propagação, mediante a formação de gemas ou embriões somáticos (Landa, 2000).

Com base na literatura revisada, um fator determinante para o êxito da resposta morfogênica *in vitro*, envolve a polaridade e a orientação do explante no meio de cultivo. Coleman e Thorpe (1985) definem polaridade, como bipolar, constituindo-se o primeiro indicador morfológico visível de um estágio interno assimétrico em um sistema vivo, e sendo um componente fundamental de diferenciação e organização espacial. Distinguem-se três tipos de polaridade morfológica: 1) equipolaridade (morfológica similar); 2) bipolaridade (morfológica não similar); e 3) polaridade radial. Com relação ao mecanismo de sinalização, dois tipos são evidenciados: a)

polaridade intrínseca, pela qual células e tecidos dos organismos já possuem uma pré-estabelecida assimetria interna ou alternada; e b) um período refratário, pelo qual cada célula, após recepção de um sinal morfogênico, prevê recepção de futuros sinais de células adjacentes. Em geral, os termos polaridade e orientação podem ser permutáveis e usados comumente (Cove, 2000).

O desenvolvimento de órgãos (organogênese) pode ser descrito como uma série coordenada de divisões celulares, com subsequente alongamento (Davies, 1987; Salisbury e Ross, 1992; Fosket, 1994; Buchanan et al., 2000). A especialização de tipos celulares dentro de um órgão (diferenciação) é o resultado de uma expressão seletiva de um conjunto particular de genes dentro de um genoma de cada célula. Evidentemente que a coordenação destes processos celulares, durante o desenvolvimento, requer uma comunicação entre estas células. O conceito de que fitorregulador participa da coordenação do crescimento e o desenvolvimento, atuando como mensageiros químicos entre as células, origina-se, em parte, de numerosas observações sobre a influência destas substâncias nas taxas de divisão celular e na taxa e direção da expansão celular. Além disso, existem evidências crescentes de que todos os cinco grupos de fitorreguladores podem atuar estimulando ou reprimindo genes específicos e de que muitas respostas observadas devido à ação de fitorreguladores são os resultados de tais expressões gênicas diferenciais (Davies, 1987; Buchanan et al., 2000).

Zimmerman et al. (1985) mencionam que, além do balanço hormonal endógeno, outro fator determinante para o êxito da morfogênese *in vitro* são os fitorreguladores exógeno, por constituírem os principais controladores desse processo. Os fitorreguladores, quando biossintetizados pelas plantas, são denominados de hormônios vegetais, desempenhando importantes funções na regulação do crescimento e desenvolvimento destas plantas.

Os mesmos autores seguem mencionando que secções de gemas jovens de *Citrus* acumulam os mais altos níveis de citocinina durante a dormência, do que secções de gemas adultas. Os autores acreditam que os altos níveis de citocinina em gemas jovens sejam o fator responsável pelo crescimento destas secções, quando tomadas a partir de plantas jovens. Para estes autores, durante os processos morfogênicos, a indução de primórdio caulinar ou radicular em calos ou suspensão celular de diferentes espécies, necessita de balanços adequados de fitorreguladores

no meio de cultura, para permitir a iniciação de um desenvolvimento organizado. Esta iniciação se estabelece graças a um sinal produzido na massa celular, desencadeando mudanças associadas aos fenômenos de desdiferenciação celular, interação celular e reação de sinais específicos.

Torrey, citado por Coleman e Thorpe (1985), idealizou um modelo simples de desenvolvimento polarizado na planta, em que ápices radiculares poderiam ser locais primários da biossíntese de citocinina e ápices caulinares poderiam ser locais primários da biossíntese de auxina. Conseqüentemente, a polarização mais adiantada no desenvolvimento do embrião poderia envolver a separação celular e elaboração de tais locais biossintéticos nas populações de células, compreendendo os respectivos ápices (Coleman e Thorpe, 1985).

Estudos de reguladores de crescimento em pesquisa de cultura de células e tecidos vegetais têm sido amplamente relatados. De acordo com Mok et al. (1987), a manipulação de cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais, com importantes aplicações em propagação e modificação genética de plantas, é altamente dependente do uso pontual de reguladores de crescimento. Contrariamente, sistemas de culturas de tecidos são úteis como bioensaios para definir a atividade reguladora de muitos compostos. A descoberta da cinetina [N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6-amino] por Miller et al. (1956), foi particularmente relevante neste contexto. Isto porque no teste desta citocinina e estruturas químicas análogas, a atividade biológica foi dependente de bioensaios de cultura de tecidos, com o que as subseqüentes avaliações de citocininas sintéticas criaram muitas novas oportunidades no rendimento de cultura de células e tecidos vegetais.

As citocininas são compostos com estrutura semelhante à da adenina, as quais promovem divisão celular e têm outras funções similares à cinetina. Esta foi a primeira citocinina descoberta. Recebeu este nome, pela sua habilidade em promover a citocinese (divisão celular). Embora sendo um composto natural, a cinetina não é produzida pela planta, razão pela qual é, normalmente, considerada uma citocinina “sintética”. A mais comum das citocininas biossintetizadas pela planta é a zeatina (Miller, 1961), recebendo este nome por ter sido isolada do milho (*Zea mays*) (Weaver, 1972; Salisbury e Ross, 1992; Fosket, 1994; Arteca, 1996). São, geralmente, encontradas em altas concentrações nas regiões meristemáticas e tecidos em contínuo crescimento, tais como raízes, folhas jovens, frutos em

desenvolvimento, e sementes (Mauseth, 1991; Raven, 1992; Salisbury e Ross, 1992; Arteca, 1996). Acredita-se que elas são biossintetizadas nas raízes e translocadas, via xilema, para a parte aérea (Baker, 1983; Salisbury e Ross, 1992; Arteca, 1996). Com relação à biossíntese, esta ocorre através de modificação bioquímica de adenina; e sua degradação ocorre devido à enzima citocinina oxidase, que remove a ramificação lateral e libera a adenina (Salisbury e Ross, 1992; Fosket, 1994).

Segundo Mok et al. (2000) semelhantemente a todos os outros fitorreguladores, as citocininas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal e também, de vital importância para manipulações de células e tecidos vegetais *in vitro*. Atribui-se a elas amplo espectro de atividade fisiológica: estimula a divisão celular; a morfogênese (formação de calo, gemas/iniciação de brotos) em cultura de tecido; o crescimento de gemas laterais, liberando-as da dominância apical; a expansão foliar, resultante do alargamento celular; pode estimular a abertura estomática em algumas espécies; promove a conversão de etioplastos em cloroplastos via estimulação de sínteses de clorofila (Burkhanova et al., 1984; Davies, 1987; Pierik, 1990; Raven, 1992; Salisbury e Ross, 1992; Arteca, 1996; Brum et al., 2002). As citocininas, de forma geral, promovem produção de partes aéreas, mas seu excesso pode ser inibitório e levar ao encurtamento dos entrenós e a problemas na fase de enraizamento (Lane, 1979; Leshem et al., 1988). Outros efeitos residuais atribuídos às citocininas têm sido observados nas plantas após o transplântio. Menor capacidade de sobrevivência, quebra da dominância apical, deformação de frutos e manutenção de um hábito arbustivo, são algumas dessas características (Grattapaglia e Machado, 1998; Silva et al., 2003).

As citocininas podem ser classificadas pelo menos em dois grupos gerais: aquelas derivadas de adenina e aquelas de difeniluréia (Burkhanova et al., 1984; Mok e Mok, 1985; Mok et al., 1987). As citocininas naturais, bem como muitas sintéticas, contêm na posição N⁶ um radical adenínico. Entretanto, no início de 1955, um composto até então não relatado, DPU (N, N'-difeniluréia), foi identificado, agindo com propriedades reguladoras de crescimento. Segundo Mok e Mok (1985) e Mok et al. (1987), embora a atividade do DPU tenha se mostrado baixa, quando comparada àquela das citocininas derivadas da adenina, vários compostos feniluréia com alta atividade citocinínica foram descobertos, dentre eles, o 4PU-30 [N-fenil-N'-(2-cloro-4-piridil) uréia] e o TDZ [N-fenil-N'-1, 2, 3-tiadiazol-5-il-uréia], que exibiram uma

atividade similar à zeatina [(E)-2-metil-4-(1H-purina-6-il-amino)-2-buten-1-ol] em vários bioensaios.

Compostos semelhantes à feniluréia, e com estruturas químicas marcadamente distintas das citocininas adenínicas, ao apresentarem uma atividade biológica similar, podem ser importantes para estudos do modo de ação das citocininas. Em adição, devido as suas altas atividades, alguns destes compostos poderiam ter aplicações usual e econômica na cultura de tecidos (Mok e Mok, 1985; Mok et al., 1987).

O TDZ é um composto pertencente à classe das tiadiazoluréias (Mok et al., 1982) e foi primeiramente utilizado como desfolhante do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) com o nome comercial de “DROPP” (uma sintética análoga de difeniluréia) (Mok e Mok, 1985). Interessante é que o composto induz a desfolhação sem aparente quebra da clorofila. O efeito desfolhante parece restringir-se a plantas da família Malvaceae, visto que, a partir de concentrações acima de 100 µM, não causou queda foliar em plantas de várias outras dicotiledôneas (Mok e Mok, 1985; Mok et al., 1987).

A propriedade biológica do TDZ, como regulador de crescimento, foi demonstrada, pela primeira vez, em culturas de calo de *Phaseolus lunatus* cv. Kingstom por Mok et al. (1982). O TDZ não só estimulou a proliferação de calo, como também superou a atividade citocínica das demais tiadiazoluréias testadas. Burkhanova et al. (1984) verificaram que o TDZ aumenta marcadamente a bio massa de cultura de célula de tabaco em suspensão; retarda a senescência de folhas de cevada; estimula a germinação de sementes de alface; promove o crescimento de discos foliares de plântulas estioladas de feijoeiro e induz a atividade da nitrato redutase em embriões isolados de milho. Nestes dois últimos bioensaios, os autores observaram que a ação do TDZ foi semelhante àquela do BAP (N⁶-benzilaminopurina). Além desse resultado, estes autores salientam a necessidade de se investigar a dinâmica de desenvolvimento da resposta e das curvas de concentração do TDZ na planta, uma vez que ele atuou, seguindo os mesmos mecanismos do BAP (uma análoga direta da zeatina).

O TDZ tem mostrado grande capacidade em estimular a formação de gemas, principalmente em espécies que mostram baixa eficiência organogênica, quando cultivadas em meio de cultura com adição de citocininas comumente usadas em

cultura *in vitro* (Mante et al., 1989; Dolcet-Sanjuan et al., 1991; Gribaudo e Fronda, 1991; Preece et al., 1991; Huetteman e Preece, 1993; Lima e Gonçalves, 1998).

Segundo Kefford et al. (1968), Einset e Alexander (1984), Mok e Mok (1985), van Nieuwkerk et al., (1986), Lu (1993) e Lima e Gonçalves (1998), o TDZ é mais estável e resistente às oxidases e, biologicamente, mais ativo a baixas concentrações, quando comparado às citocininas derivadas da adenina, como o BAP, a zeatina, ou i^6 Ade [N^6 -(Δ^6 -isopentenil) adenina] na maioria das espécies em que foi testado, particularmente nas espécies lenhosas. Estas propriedades podem, futuramente, contribuir para aumentar o uso do TDZ nas manipulações de cultura de células e tecidos vegetais (Mok et al., 1987).

O TDZ foi também utilizado para induzir a embriogênese somática em várias espécies como *Arachis hypogaea* (Saxena et al., 1992; Murthy et al., 1995), *Nicotiana tabacum* (Gill e Saxena, 1993), *Pelargonium x hortorum* (Visser et al., 1992; Hutchinson et al., 1996), *Cayratia japonica* (Zhou et al., 1994) e em *Eucalyptus* spp. (Tibok et al., 1995).

Estudos do TDZ em cultivos celulares de certas espécies têm evidenciado alguns problemas ou desvantagens, como hiperidricidade (Briggs et al., 1988; Gribaudo e Fronda, 1991), morfologia anormal de folhas (van Nieuwkerk et al., 1986; Briggs et al., 1988; Gribaudo e Fronda, 1991; Kim et al., 1997), gemas curtas e não alongadas (Preece e Imel, 1991; Kim et al., 1997), gemas fasciadas (Huetteman e Preece, 1993); redução ou inibição total do enraizamento (Badzian et al., 1989; Gribaudo e Fronda, 1991).

Em cultura de tecidos, altas concentrações de citocininas adenínicas têm sido necessárias para divisão e diferenciação celular (Mok et al., 1987). Segundo estes autores, uma das razões é a ocorrência de enzimas degradadoras de citocininas (citocinina oxidase), as quais quebram as ligações do lado não-saturado N^6 -isoprenóide. Citocininas sintéticas, como cinetina e BAP, são menos susceptíveis à ação da citocinina oxidase, mas sendo, geralmente, menos ativas que as citocininas naturais, como zeatina e i^6 Ade.

O BAP é uma citocinina sintética, apresentando na posição N^6 um radical adenínico. Seu principal atributo é promover a formação de gemas e alongamento destas (brotação) em diversas espécies. Parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea, indução de gemas adventícias e formação de brotos

(Grattaplagia e Machado, 1998). Diversos trabalhos corroboram com esta afirmação, como os de Peres-Molphe-Balch e Ochoa-Alejo (1997), Moreira-Dias (1998), García-Luis et al. (1999) e Bórdon et al. (2000) em citros; Almeida et al. (1998) em abacaxizeiro; Vesco e Guerra (1999) em goiabeira; Dunstan et al. (1985), Arello et al. (1989), Pasqual e Ishida (1992), Yui et al. (1993), Ding e Wang (1996), Morales et al. (1999) e Schwartz et al. (2000) em macieira; Brum et al. (2002) em figueira; Lima e Gonçalves (1998), Harvé et al. (2001) em eucalipto; Moran Robles (1978, 1979), Scorza e Janick (1980), Baccarin (1988), Faria e Segura (1997), Biasi et al. (2000), Hall et al. (2000), Alexandre (2002) e Couceiro (2002) em maracujazeiro, dentre outros.

O propósito deste estudo foi o de investigar a morfologia e a histologia de segmentos de hipocótilo do maracujazeiro, extraídos de cinco diferentes posições do eixo hipocotiledonar e cultivados *in vitro*, sob a influência de diferentes concentrações de TDZ e BAP adicionadas ao meio de cultivo e em diferentes orientações dos explantes no meio de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H. & PICANÇO, M.C. Eds. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. pp.9-31.
- ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. 2002. 102pp. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ALMEIDA, W.A.B. de; MATOS, A.P. de; SOUZA, A. de S. Influência da benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de plântulas do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas *in vitro*. **Magistra**, 10: 55-63, 1998.
- APPEZATO-DA-GLORIA, da B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2007-2013, 1999.
- ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Influência do ANA e BAP sobre a multiplicação de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv Melrose *in vitro*. **Ciência Prática**, 13: 306-313, 1989.
- ARTECA, R.N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall, 1996. 332pp.
- BACCARIN, M. N. R. A. **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* sp.** 1988. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia "Luis de Queiroz", Piracicaba.
- BADZIAN, T.; FOTYMA-KERN, J.; HENNEN, G.R.; OGLESBY, P. The influence of 6-benzyladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassica actinophylla* Endl. cv. Amate shoot explants. **Acta Horticulturae**, 251: 191-197, 1989.
- BAKER, J.E. Preservation of cut flowers. In: NICKELL, L.G. (Ed.). **Plant growth regulating chemicals**. Florida: C.R.C. Press, 2: 177-191. 1983.
- BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *Passiflora amethystina* Mikan. **Euphytica**, 98: 121-127, 1997.

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

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, 57: 661-665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Advances in Horticultural Science**, 8: 171-175, 1994.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, 86: 159-166, 2000

BRIGGS, B.A.; McCULLOCH, S.M.; EDICK, L.A. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. **Acta Horticulturae**, 227: 330-333, 1988.

BRUCKNER, C. H. **Auto-incompatibilidade no maracujá (*Passiflora edulis* Sims)**. 1994. 85pp. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D.; MORAES, C.F. de; REGAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. da. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, 370: 45-57, 1995.

BRUM, G.R.; SILVA, A.B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Edição especial, pp.1403-1409, 2002.

BUCHNAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1387pp.

BURKHANOVA, E.A.; FEDINA, A.B.; BASKAKOV, Y.A.; KULAEVA, O.N. Comparative study of the action of 6-benzylaminopurine, thidiazuron, and cartolin on growth of intact pumpkin seedlings. **Soviet Plant Physiology**, 31: 8-12, 1984.

COLEMAN, W.K. & THORPE, T.A. Polarity. In: PHARIS, R.P.; REID, D.M. (Eds.). **Hormonal regulation of development III: role of environmental factors**. Berlin: Springer-Verlag. pp.116-138, 1985.

- COUCEIRO, A. M. **Organogênese in vitro em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 2002. 95pp. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- COVE, D.J. The generation and modification of cell polarity. **Journal of Experimental Botany**, 51: 831-838, 2000.
- d'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, 12: 220-225, 1993.
- DAVIES, P.J. (Ed.) **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1987, 681pp.
- DING, A.P.; WANG, H.F. Factors affecting the differentiation of adventitious buds on apple leaves cultured in vitro. **China Fruits**, 4: 20-21, 1996.
- DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, 10: 240-242, 1991.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *Passiflora amethystina* Mikan. and *Passiflora cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, 13: 103-106, 1993.
- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, 15: 106-110, 1995.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36: 211-217, 1994.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile buds of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 26: 23-27, 1991.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, W.R. Propagation in vitro of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 4: 55-60, 1985.
- EINSET, J.W.; ALEXANDER, J.H.. Multiplication of *Syringa* varieties and species in tissue cultures. **Proceedings of International Plant Protection Society**, 34: 628-636. 1984.

- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, 32: 1276-1277, 1997.
- FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. de. Germoplasma de *Passiflora*. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp.187-200.
- FOSKET, D.E. **Plant growth and development**: a molecular approach. San Diego: Academic Press. 1994, 580pp.
- FOUQUÉ, A. Espécies frutiéras d'Amérique tropicale: 4. Les passifloracées. **Fruit's D'Outre Mer**, 27: 368-382, 1972.
- FREITAS, P.C.D. de. Possibilidades farmacológicas. In: RUGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. pp.210-217.
- GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J. L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, 84: 715-723, 1999.
- GILL, R.; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. **Plant Cell Reports**, 12: 154-159, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S.; SILVA, J.R. da; MACHADO, M.A. Cultura de tecidos de maracujá. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp.61-77.
- GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. 1: 183-260.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. **HortScience**, 26: 1083, 1991.
- HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, 48: 673-680, 2000.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1990. pp.203-212.

- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagación de Plantas**: principles and practices. 5a ed. México: Compañía Editorial Continental S.A. 1991. 760pp.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; JEAN-NOËL, M.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, 161: 645-653, 2001.
- HOFFMANN, M. Polinização do maracujá amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá**: temas selecionados (1). Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. pp.58-70.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 33: 105-119, 1993.
- HUTCHINSON, M.J.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron: evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bayley). **Journal of Plant Physiology**, 149: 573-579, 1996.
- JOLY, A.B. Família Passifloraceae. In: _____. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 11^a ed. São Paulo: Nacional, 1993. pp.478-480.
- KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit). **Annals of Botany**, 65: 337-3369, 1990.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, 147: 281-284, 1995.
- KEFFORD, N.P.; ZWAR, J.A.; BRUCE, M.I. Antagonism of purine and urea cytokinin activities by derivatives of benzylurea, In: WIGHTMAN, E. & SETTERFIELD, G. (Eds.). **Biochemistry and physiology of plant growth substances**. Runge Press, Ottawa. 1968, pp.61-69.
- KERBAUY, G.B. Clonagem *in vitro* de orquídeas através de ápices radiculares. **Anais...** 1º Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais. Brasília. EMBRAPA/DDT. 1985. pp.33-35.
- KERBAUY, G.B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Reports**, 3: 27-29, 1984a.

- KERBAUY, G.B. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). **Zeitschrift fur Pflanzensuchtung**, 113: 287-291, 1984b.
- KERBAUY, GB. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1999. 2: 519-531.
- KIM, M.K.; SOMMER, H.E.; BONGARTEN, B.C.; MERKLE, S.A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. **Plant Cell Reports**, 16: 536-540, 1997.
- KOSKY, R.G. Cultivo de células y tejidos. In: PONCE, J.N.P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998. 1: 25-44.
- KUNIEDA, M.K.; KERBAUY, G.B. Formação de gemas em raízes adventícias de couve-flor cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, 9: 231-238. 1986.
- LANDA, F. de S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D. de O.; BUENO FILHO, J.S. de S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Edição especial, 24: 56-63, 2000.
- LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, 16: 337-342, 1979.
- LEITÃO FILHO, H. de F.; ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO CULTURA DO MARACUJÁ, 1., 1971, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974. pp.01-13.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, 62: 271-276, 1988.
- LIMA, A. de A.; CALDAS, R.C.; CUNHA, M.A.P. da; SANTOS FILHO, H.P. Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 21: 318-321, 1999.
- LIMA, M.M. de, GONÇALVES, N.A. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, 53: 49-56, 1998.

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

LOPES, S.C. Citogenética do maracujazeiro *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **A cultura do maracujá no Brasil.** Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp.201-209.

LOPES, S.C. Citogenética do maracujazeiro *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado.** Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. pp.19-23.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Passifloraceae. In: _____. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. pp.371-374.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 29: 92-96, 1993.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; D'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, 13: 697-702, 1994.

MANICA, I. **Fruticultura Tropical: 1. maracujá.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 160pp.

MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 19: 10-11, 1989.

MAUSETH, J.D. **Plant anatomy.** California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1988, 560pp.

MENZEL, C.M.; WINKS, C.W.; SIMPSON, D.R. Passionfruit in Queensland. 3. Orchard management. **Queensland Agricultural Journal**, 115: 155-164, 1989.

MILLER, C.O. Kinetin and related compounds in growth. **Annual Review Plant Physiology** 12: 395-408. 1961.

MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKUMURA, F.S.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. **Journal of the American Chemical Society**, 78: 1375-1380, 1956.

MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 46: 161-164, 1996.

MOK M.C.; MARTIN R.C.; MOK D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 36: 102-107, 2000.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [^{14}C] - thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, 65: 427-432, 1985.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, 21: 1509-1511, 1982.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, 22: 1194-1197, 1987.

MONTEIRO, A.C.B. de A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, 57: 571-573, 2000.

MONTEIRO-HARA, C.B de A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 82pp. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R. de L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, 5: 174-177, 1999.

MORAN ROBLES, M. J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, 33: 693-699, 1978.

MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *Passiflora mollissima* Bailey en culture “*in vitro*”. **Turrialba**, 29: 224-228, 1979.

MOREIRA-DIAS, J.M. **Organogenesis *in vitro* en segmentos de epicotilo de citrange troyer**. 1998. 317p. Tesis (Doctoral em Agronomía) - Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

MORTON, J.F. Passionfruit. In: _____. **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource Systems, Inc., 2000. p.320-328. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/passionfruit.html>>. Acesso em: 24 mar. 2002.

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

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, 94: 268-276, 1995.

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tecidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía**, 42: 63-76, 1966.

OLIVEIRA J.C. de; FERREIRA, F.R.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K. Caracterização e avaliação de germoplasma de *Passiflora edulis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. pp.591-596.

OLIVEIRA, J.C. de; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal, FUNEP, 1991, pp.211-239.

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, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. and *Passiflora incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, 46: 777-785, 1995b.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**, 42: 461-468, 1995a.

PAIVA, P.D. de O. **Estabelecimento *in vitro* de estrelicia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura**. 1998. 84pp. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S. Efeito de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira MI-793. **Revista Ceres**, 39: 584-590, 1992.
- PEREIRA, A.; BERTONI, B. PPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, A.; JANUÁRIO, A.; LOURENCO, M; FRANCA, S. Micropropagation of *Photomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 60: 47-53, 2000.
- PEREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, 32: 931-934, 1997.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326pp.
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C.; ROTH, P.L. Micro-and cutting propagation of Silver Maple: 1 - results with adult and juvenile propagules. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 116: 142-148, 1991.
- PREECE, J.E.; IMEL, M.R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* P.J.M. hybrids. **Scientia Horticulturae**, 48: 159-170, 1991.
- PURSEGLOVE, J.M. Passifloraceae. In: _____. **Tropical crops: dicotyledons**. 3^a ed. London: Longman Group Limited, 1974. pp.420-429.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. (Eds.). **Biology of plants**. New York: Worth Publications, 1992, 724pp.
- RÊGO, M.M. **Indução *in vitro* de haplóides e de poliplóides e de detecção molecular de alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 2001. 64pp. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Eds.). **Plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag. 1977, 806pp.
- REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; TOLEDO PICOLI, E.A.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, 39: 618-622, 2003.

- RUGGIERO, C. Enxertia do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **Cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991, pp.43-60.
- RUGGIERO, C. Implantação da cultura e propagação. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. pp.40-57.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 64pp.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682pp.
- SARAVITZ, C.H.; BLAZICH, F.A.; AMERSON, H.V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of fraser fir. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 118: 163-167, 1993.
- SAXENA, P.K.; MALIK, K.A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. **Planta**, 187: 421-424, 1992.
- SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 22: 77-79, 2000.
- SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 105: 892-897, 1980.
- SERRA, A. G.P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 1999. 72pp. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, A. C.; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Bahia: Universidade Estadual da Bahia, 1994. pp.1-5.
- SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; DUTRA, L.F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* lood. hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, 27: 255-260, 2003.
- SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 27: 639 - 646, 1992.

- SOUZA, A.G. de; SANDI, D. Industrialização. In: BRUCKNER, C.H. & PICANÇO, M.C. Eds. **Maracujá**: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. pp.305-343.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. 2ª edição, Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317pp.
- TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, 110: 139-145, 1995.
- van NIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, 21: 516-518, 1986.
- VAZ, R.L. A biotecnologia aplicada à fruticultura: necessidades e perspectivas potenciais. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A. (Coords.). **A Cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp.241-247.
- VESCO, L. D.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) - Lírio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 21: 60-64, 1999.
- VISSER, C.; QURESHI, J.A; GILL, R.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in *Geranium* hypocotyl cultures. **Plant Physiology**, 99: 1704-1707, 1992.
- WEAVER, R.J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1972. 594pp.
- YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J.S. Efeito de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de porta-enxertos de macieira cv. M.7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 28: 597-602, 1993.
- ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36: 73-79, 1994.
- ZIMMERMAN, R.H.; HACKETT, W.P.; PHARIS, R.P. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. In: PHARIS, R.P.; REID, D.M. (Eds.). **Hormonal regulation of development III**: role of environmental factors. Berlin: Springer-Verlag. pp.79-115, 1985.

CAPÍTULO 1

Influência da polaridade na resposta morfogênica de segmentos hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. em meios de cultura contendo TDZ e BAP

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da polaridade na resposta morfogênica de segmentos hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, cultivados em distintas orientações em meios de cultura contendo TDZ e BAP. Os segmentos foram extraídos, assepticamente, de plântulas germinadas e crescidas *in vitro*, e cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de diferentes concentrações isoladas de TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina). Os cinco explantes hipocotiledonares de cada plântula, numerados de 1 a 5, e, nesta ordem, foram cultivados nos referidos meios, seguindo-se três orientações: a) orientação vertical normal; b) orientação horizontal, e c) orientação vertical invertida, em cada frasco de cultivo. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados e transferidos para sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 citocininas x 3 orientações x 5 segmentos x 6 períodos, com 10 repetições. A resposta morfogênica foi avaliada com base nas análises morfológica, tomadas de sete em sete dias até completar os 42 dias de cultivo. Os resultados mostraram que: a) a resposta morfogênica e a rota morfogênica em segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro são dependentes da presença e da natureza química das citocininas adicionadas ao meio de cultura em interação com o modo pelo qual o explante é inserido (orientado) no meio de cultura; b) o maior número médio de gemas por explante foi auferido pelo extremo distal dos segmentos hipocotiledonares, cultivados em meios contendo BAP; c) a presença de ambas as classes de citocininas no meio de cultivo inibiu, por completo, a rizogênese. Raízes adventícias se formaram apenas no extremo proximal dos explantes cultivados em meio com ausência de citocininas, nas orientações vertical normal e horizontal; d) a polaridade fisiológica que se estabelece nos

extremos dos segmentos hipocotiledonares, bem como a magnitude desta polaridade, pode ser alterada pela natureza química da citocinina, aplicada ao meio de cultivo, e pela orientação do explante nesses meios. Esta polaridade é marcadamente mais forte, quando se cultiva os segmentos hipocotiledonares na orientação vertical normal, em meios com presença de BAP. Na presença do TDZ, a polaridade não se estabeleceu; e) não houve gradiente de resposta morfogênica entre os segmentos, tomados, sequencialmente, ao longo do eixo hipocotiledonar; f) os resultados deste trabalho adicionam subsídios para o entendimento da polaridade que se estabelece nos extremos de segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro, bem como do potencial indutor do TDZ na morfogênese.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de vanguarda na produção mundial de maracujá amarelo. O cultivo do maracujazeiro está em franca expansão em toda região tropical e sub-tropical brasileira. Todavia, a expansão e melhoria da cultura podem ser conseguidas pelo uso de biotecnologias modernas, visando obter plantas geneticamente superiores, as quais apresentem homogeneidade cultural, compatíveis com a necessidade do mercado (Baccarin, 1988; Kantharajah e Dodd, 1990; Vaz, 1991).

Atualmente, técnicas de cultivo *in vitro* em *Passiflora* permitem lograr êxito na obtenção de brotos em diferentes espécies desse gênero, utilizando-se vários tipos distintos de explantes (Nakayama, 1966; Moran Robles, 1978; Scorza e Janick, 1980; Kantharajah e Dodd, 1990; d'Utra Vaz et al., 1993; Otoni et al., 1995; Alexandre, 2002; Couceiro, 2002). Por exemplo, Couceiro (2002) obteve elevado número de gemas e brotos, utilizando explantes hipocotiledonares, a partir de plântulas de maracujazeiro germinadas e crescidas *in vitro*. Esse autor constatou que a dose de 0,7 mg L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina) induziu a melhor resposta morfogênica *in vitro*, confirmando as conclusões de trabalhos anteriores (Moran Robles, 1978, 1979; Scorza e Janick, 1980; Kantharajah e Dodd, 1990; d'Utra Vaz et al., 1993), sobre a eficiência dessa citocinina na indução do processo morfogênico dessa planta.

Nos trabalhos revisados, observa-se uma ênfase quase absoluta para a investigação das propriedades do BAP, no referente aos estudos morfogênicos *in vitro* do maracujazeiro, sendo quase inexistente a investigação quanto a outros fitorreguladores menos empregados na cultura de células e tecidos vegetais, destacando o TDZ (Tidiazuron). Este fitorregulador pertence à classe das tiadiazolurêias (Mok et al., 1982) e foi primeiramente utilizado como desfolhante do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (Mok e Mok, 1985).

O TDZ tem mostrado grande capacidade em estimular a formação de gemas, principalmente em espécies que apresentam baixa eficiência organogênica, quando cultivadas em meio de cultura com adição de citocininas comumente usadas em cultura *in vitro* (Mante et al., 1989; Dolcet-Sanjuan et al., 1991; Gribaudo e Fronda, 1991; Preece et al., 1991; Huetteman e Preece, 1993; Lima e Gonçalves, 1998).

Segundo Kefford et al. (1968), Einset e Alexander (1984), Mok e Mok (1985), van Nieuwkerk et al., (1986), Lu (1993) e Lima e Gonçalves (1998), o TDZ é mais estável e resistente às oxidases e, biologicamente, mais ativo a baixas concentrações, quando comparado às citocininas derivadas da adenina, como o BAP, a zeatina, ou i⁶Ade [N⁶-(Δ^6 -isopentil) adenina] na maioria das espécies em que foi testado, particularmente em espécies lenhosas (Einset e Alexander, 1984; Mok e Mok, 1985; van Nieuwkerk et al., 1986). Estas propriedades podem, futuramente, contribuir para aumentar o uso do TDZ nas manipulações de cultura de células e tecidos vegetais (Mok et al., 1987).

Observa-se que os estudos têm se preocupado com o tipo de material vegetal e fitorregulador empregado, e deixando em segundo plano o fator polaridade. Este fator tem-se apresentado determinante para o êxito da resposta morfogênica *in vitro*. Couceiro (2002) comparou a orientação dos explantes hipocotiledonares, e constatou que o protocolo mais adequado foi o cultivo dos explantes na orientação vertical normal, em meio MS, adicionado de 0,7 mg L⁻¹ de BAP, sob condição de luz por 40 dias. O mesmo autor acrescenta que, o contato com o meio determinou a via morfogênica no maracujazeiro.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da polaridade na resposta morfogênica de segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro cultivados em distintas orientações em meios de cultura contendo TDZ e BAP e incubados durante 42 dias na sala de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Foram utilizados, como explantes, segmentos hipocotiledonares, obtidos de plântulas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), germinadas e crescidas *in vitro*. As sementes foram extraídas de frutos maduros, obtidos de uma única planta e procedentes do Pomar da Universidade Federal de Viçosa. Após completa remoção do tegumento, mediante uso de uma mini-morsa (Couceiro, 2002), as sementes foram desinfestadas com ácido hipocloroso a 0,5 % (v/v) por cinco minutos, seguidos de quatro enxaguaduras com água desionizada estéril, em tempos de 5, 10, 10 e 10 minutos, respectivamente; e, posteriormente inoculando as sementes, uma por tubo de ensaio (25 x 135 mm), o qual continha aproximadamente, 10 mL de meio contendo os minerais nutrientes de MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de sacarose (3 %, p/v) e ágar ISO FAR[®] (0,8 %, p/v). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da adição do ágar. Os tubos com as sementes inoculadas foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em grades metálicas e mantidos em câmara de cultivo à temperatura de 27 ± 2 °C, em escuro, por 20 dias.

De cada plântula estiolada, vigorosa, com hipocótilo retilíneo e comprimento mínimo de 7 cm, foram obtidos cinco segmentos hipocotiledonares (10 a 12 mm de comprimento). Para se especificar sua posição ao longo do eixo do hipocótilo, os segmentos (explantes) foram numerados de 1 a 5, sendo 1, mais próximo ao nó cotiledonar e o 5, mais distante deste.

2. Condições de cultivo

Os explantes hipocotiledonares foram cultivados em meio contendo os minerais nutrientes de MS, com adição de sacarose (3 %, p/v), vitaminas de White (1951) e de duas citocininas: TDZ (tidiazuron, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) e BAP (6-Benzilaminopurina, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), respectivamente nas concentrações de: 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ e 0,0 e 0,7 mg L⁻¹, sem combinação entre as mesmas. Estas concentrações foram tomadas com base em trabalhos anteriores (dados não publicados). Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$,

antes da adição de 0,7 % (p/v) de ágar (ISO FAR[®]) fundente. Em seguida, foram vertidos cerca de 30 mL de meio de cultivo em frascos de vidro, com capacidade volumétrica de 320 mL. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. Após esta operação, os explantes hipocotiledonares, numerados de 1 a 5, e nesta ordem, foram cultivados. Nesse cultivo, com base na polaridade fisiológica, os explantes foram inoculados no meio de cultura, seguindo-se três orientações: a) orientação vertical normal, onde aproximadamente 2 a 3 mm do extremo proximal dos explantes foram inseridos no meio de cultivo; b) orientação horizontal, em que os segmentos de hipocótilo foram colocados deitados sobre a superfície do meio, com o extremo distal voltado para o interior do frasco e o proximal voltado para o exterior, afastado 1,0 a 1,5 cm da parede do frasco; e c) orientação vertical invertida, onde aproximadamente 2 a 3 mm do extremo distal dos explantes foram inseridos no meio de cultivo. Cada tratamento constou de 10 repetições (10 frascos), com 5 explantes (um segmento hipocotiledonar) por frasco de cultivo. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). Em seguida, transferidos para sala de cultivo, dispostos em estantes, e incubados à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes (OSRAM[®] 40 W, luz do dia), por 42 dias.

A resposta morfogênica dos distintos explantes hipocotiledonares foi avaliada com base em uma análise morfológica descritiva e uma análise estatística dos dados.

3. Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada, com base em observações visuais, tomadas de sete em sete dias até completar os 42 dias de cultivo, totalizando 6 períodos de observações. As observações periódicas visaram o acompanhamento da evolução do processo morfogênico, até aos 42 dias de cultivo dos explantes. Para esta análise, conduziu-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial $3 \times 3 \times 5 \times 6$ (citocininas x orientações x segmentos x períodos), com 10 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de cultivo, contendo 5 segmentos do eixo hipocotiledonar. As observações visuais foram realizadas, mediante auxílio de lupa binocular (ZEISS[®]). Foram avaliadas as

seguintes características: número e comprimento de raízes; formação e tamanho dos calos (mm²) e número de gemas. Considerou-se calo a estrutura, cuja proliferação celular no extremo dos segmentos hipocotiledonares media mais de 2 mm de largura por 1 mm ou mais de altura. Proliferações com valores iguais ou inferiores a estes, foram denominadas, simplesmente, de intumescimento do extremo. A medição do tamanho do intumescimento ou calo foi realizada através de papel milimetrado.

4. Análise estatística¹

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 3 (citocininas x orientações), com 10 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de cultivo, contendo 5 segmentos do eixo hipocotiledonar. Sendo as médias dos fatores comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os dados (tamanho de calo e número de gemas) foram previamente transformados em $\sqrt{x+1}$, com o propósito de homogeneização das variáveis dos erros experimentais (Gomes, 1995).

RESULTADOS

1. Análise descritiva da resposta morfogênica em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro

1.1. Em meio de cultura com ausência de citocinina (controle)

1.1.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo

Nesse extremo, respostas morfogênicas macroscópicas foram observadas, apenas em explantes cultivados nas orientações vertical normal e horizontal. Na orientação vertical normal, formaram-se apenas gemas² (Figura 1A). Já na orientação horizontal, além de gemas, o extremo distal experimentou um intumescimento suave

¹ Para esta análise, devido a melhor repetibilidade da resposta macroscópica do processo morfogênico, foi considerado apenas o período de 42 dias de cultivo.

² Neste experimento, os brotos que se formaram, foram incluídos na categoria de gemas, dado ao seu baixo número e reduzido tamanho em todas as orientações e meios de cultivos, ao longo dos seis períodos de avaliações.

(Figura 1B), observado a partir dos 14 dias, o qual alcançou a categoria de calo verdadeiro, a partir dos 28 dias de incubação. A formação de calo se manifestou em uma pequena porcentagem de explantes, a qual foi crescente (4; 16 e 36 %, nos períodos respectivos de avaliação: 28; 35 e 42 dias). O tamanho médio dos calos variou entre 3,0 e 4,5 mm².

Com relação à formação de gemas no extremo distal, na orientação vertical invertida, não houve formação de gemas. Estas se formaram somente nas orientações vertical normal e horizontal, com média geral de gemas por explante de 5,12 e 1,84, respectivamente, e com frequência de 91,2 e 31,6 % de explantes que formaram gemas, respectivamente. Uma comparação destas duas variáveis, nas duas mencionadas orientações, mostra uma eficiência, marcadamente superior, do extremo distal naqueles explantes cultivados na orientação vertical normal, sugerindo o estabelecimento de uma polarização de maior magnitude nesse extremo, com o explante nessa orientação.

Nestas duas orientações, o extremo distal exibiu uma fina camada cicatricial sobre a face cortada, constituída de células pequenas e de cor branco-gelo. Esta característica demonstra que a formação de gemas se deu por um processo de organogênese direta. Na orientação vertical invertida, se formou uma fina camada necrosada.

1.1.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo

Para esse extremo, foram observadas respostas morfogênicas macroscópicas a partir dos 14 dias de cultivo, conforme a orientação dos explantes no meio de cultura. Com relação ao intumescimento, foram constatadas diferenças de comportamento dos explantes, nas três orientações: vertical normal, horizontal e vertical invertida, ocorrendo, respectivamente 2 a 66 %, 4 a 58 % e 22 a 94 % e de explantes intumescidos. Na orientação vertical normal formou-se, na face cortada desse extremo, uma fina camada necrosada. Diferentemente, nas duas outras orientações, condição em que este extremo não esteve diretamente dentro do meio de cultura, observou-se uma fina camada cicatricial, constituída de células pequenas e de coloração branco gelo.

À semelhança do que ocorrera no extremo distal, também no proximal, a conversão do intumescimento em calo verdadeiro foi constatada, em geral, somente,

a partir de 28 dias de cultivo. A formação de calo ocorreu nas três orientações: vertical normal, horizontal, e vertical invertida, observando-se uma variação de 4 a 62 %, de 2 a 8 % e de 2 a 8 % de explantes com calo, respectivamente. Foi baixa, portanto, a frequência de calejamento no extremo proximal. Esta foi maior, quando os explantes foram cultivados na orientação vertical normal e, de forma mais expressiva no final do período de incubação (21,4 mm²). Os calos formados nesse extremo apresentavam um formato geralmente achatado, consistência mais ou menos compacta e coloração esverdeada (Figuras 1A e 1B).

Dos dois extremos, apenas o distal foi competente para a formação de gemas, conforme apresentado anteriormente. Por outro lado, somente o proximal foi competente para o processo rizogênico, com as raízes se formando apenas quando os explantes eram cultivados nas orientações vertical normal e horizontal (Figuras 1A e 1B). Na orientação vertical normal, a frequência de explantes que enraizaram foi maior do que aquela da orientação horizontal, variando, respectivamente de 38 a 56 % e de 16 a 38 %. Na orientação horizontal, o processo rizogênico foi mais precoce, sendo as raízes já visualizadas aos sete dias de cultivo.

Com relação ao comprimento de raízes, este variou entre 4,9 e 10,7 cm e 1,0 a 20,3 cm, respectivamente para os explantes nas orientações vertical normal e horizontal.

Aos 42 dias de cultivo, em ambas as orientações, observou-se que as raízes com comprimento igual ou superior a 5 cm eram vigorosas e de coloração acinzentada a esverdeada, apresentando, muitas vezes, raízes secundárias e, geralmente, pelos absorventes em suas bases. Por outro lado, aquelas com comprimento inferior a 5 cm eram finas esbranquiçadas e, geralmente, sem pelos absorventes ou raízes secundárias.

Outro aspecto relevante a observar foi que as raízes formadas, independentemente dos tipos acima descritos, não contribuíram, positivamente, para evitar a clorose pronunciada (Figuras 1A e 1B) que se estabeleceu nas gemas formadas no extremo distal, desde o limiar do período de incubação dos explantes. A formação de raízes pareceu, ademais, não contribuir para a brotação das gemas.

No meio de cultura com ausência de citocinina exógena, ao comparar o extremo distal com o proximal, observou-se diferenças marcantes nas respostas morfogênicas. No extremo distal, o intumescimento e formação de calo somente

ocorreram, quando os explantes foram cultivados na orientação horizontal, sendo que as gemas, além de se formarem nessa orientação, se formaram também na orientação vertical normal; sendo, nesta orientação, o número médio de gema por explante marcadamente superior. No extremo proximal, o intumescimento e formação de calo ocorreram nas três orientações. Entretanto, em nenhuma delas esse extremo foi competente para a formação de gemas.

1.2. Em meio de cultura contendo BAP (0,7 mg L⁻¹)

1.2.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo

Neste extremo, a resposta morfogênica se expressou, macroscopicamente, a partir dos 14 dias de incubação, com intumescimento e formação de calo e/ou formação de gemas. Esta resposta foi dependente da orientação dos explantes no meio de cultura. Para os explantes cultivados na orientação vertical normal, não houve intumescimento e, conseqüentemente, formação de calo, ao longo de todo o período de incubação. Nas orientações horizontal e vertical invertida, sem se destacar uma da outra, verificou-se que um percentual relativamente pequeno de explantes intumescceu, sendo maior na orientação horizontal, onde a porcentagem de explantes que formou calo verdadeiro foi de 31,5 %. Com relação ao tamanho médio dos calos (4,5 e 4,1 mm², respectivamente), constatou-se que foi bastante semelhante nestas duas orientações dos explantes.

Nas orientações vertical normal e horizontal, formou-se, em sua face cortada, uma camada cicatricial composta por células pequenas e de coloração branco gelo. Já na orientação vertical invertida, formou-se uma camada necrosada, a qual evoluiu com o passar do período de incubação. Estas características foram semelhantes às aquelas já descritas para este extremo no meio de cultura com ausência de citocinina.

Outra resposta morfogênica, ocorrida no extremo distal e importante para a propagação *in vitro* do maracujazeiro, foi a formação de gemas. Como já ocorrido, para esse extremo, no meio sem citocinina (controle), também na presença de BAP, as gemas se formaram somente nas orientações vertical normal e horizontal (Figuras 1C e 1D); evento igualmente constatado, a partir dos 14 dias de cultivo. Nas referidas orientações, constatou-se porcentagem média de 87,6 e 79,2 %, respectivamente, de explantes que formaram gemas, e média geral de 7,3 e 6,08, respectivamente, de gemas por explante. Uma comparação dessas duas variáveis, nas duas orientações

referidas, evidencia uma eficiência claramente superior do extremo distal, quando os explantes são cultivados na orientação vertical normal, sugerindo o estabelecimento de uma polarização mais forte desse extremo nessa orientação. Esse fato já havia sido constatado, para este extremo e estas orientações, também no meio de cultura desprovido de citocinina, conforme descritos anteriormente.

Ao confrontar o meio de cultura contendo BAP, com o meio sem citocinina (controle), verificou-se que na presença de BAP, o número médio de gemas por explante foi marcadamente superior, tanto na orientação vertical normal, como na horizontal.

1.2.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo

Para esse extremo, os explantes cultivados nas três orientações, em meio contendo BAP, mostraram, aos 14 dias, intumescimento. Este, a partir dos 21 dias, se traduziu na formação de calos nos explantes cultivados na orientação vertical normal, seguida da horizontal, e vertical invertida. Observou-se que o tamanho médio dos calos, na orientação vertical normal ($16,3 \text{ mm}^2$), foi, em geral, mais do que o dobro desse tamanho nas outras duas orientações: horizontal ($7,7 \text{ mm}^2$) e vertical invertida ($5,02 \text{ mm}^2$, respectivamente). No final do período de incubação (aos 42 dias), o extremo proximal dos explantes cultivados na orientação vertical normal e que não formavam calo, mostraram uma fina camada superficial necrosada. Nas orientações horizontal e vertical invertida formou-se na face cortada do extremo, uma fina camada cicatricial, constituída de células pequenas, coloração branco gelo e com emergência de protuberâncias disformes. Esse comportamento do extremo proximal nas três orientações de cultivo, foi em tudo semelhante àquele observado para esse extremo, quando os explantes foram cultivados em meio com ausência de citocinina (controle).

Com relação à formação de gemas no extremo proximal de explantes cultivados em meio contendo BAP, observou-se que estas estruturas se formaram apenas nas orientações horizontal e vertical invertida. Uma comparação, destas duas orientações, mostrou uma superioridade da orientação vertical invertida, principalmente para a média de gemas por explantes (média geral 5,5, contra 3,65 na orientação horizontal).

Comparando os dois extremos, verifica-se que o intumescimento, a frequência de explantes intumescidos que formaram calo e o tamanho do calo foram mais evidentes no extremo proximal que no extremo distal, independentemente da orientação de cultivo dos explantes no meio de cultura. Não obstante, com relação à formação de gemas, houve uma maior precocidade (sete dias) do extremo distal em iniciar a formação dessas estruturas. Há que ressaltar-se que a formação de gemas dependeu, claramente, da orientação dos explantes no meio de cultura e do extremo fisiológico (polaridade) do segmento de hipocótilo. No extremo distal, gemas se formaram apenas naqueles explantes cultivados nas orientações vertical normal (Figura 1C) e horizontal (Figura 1D), em um processo de organogênese direta. No extremo proximal, a formação de gemas ocorreu apenas nas orientações vertical invertida e horizontal, condições em que este extremo, também, não estava dentro do meio de cultivo. Para esse extremo, as observações sugerem uma organogênese pela via indireta (a partir de células do calo).

A orientação vertical normal, comparada com a horizontal, proporcionou melhor resposta para formação de gemas. No extremo distal, gemas se formaram, tanto no meio controle, como na presença de BAP, de modo destacado neste último tratamento. Para estes dois meios de cultura e para estas duas orientações dos explantes, não se pode comparar a formação de gemas no extremo proximal, visto que o controle não formou gema nesse extremo (Figuras 1A e 1B). Entretanto, os dados mostraram que o BAP foi altamente competente em aumentar a eficiência da resposta para a formação de gemas em ambos extremos dos segmentos hipocotiledonares, sempre, quando esses extremos não estavam inseridos dentro do meio. Esse fato parece sugerir que esta citocinina atenua ou induz o estabelecimento da polaridade nos extremos fora de contato direto com o meio de cultura. Em contato direto com o meio de cultivo, os extremos dos explantes, ou somente intumesceram e calejaram, ou bem necrosaram (Figuras 1A, 1B, 1C e 1E). Fora do contato direto com o meio, formaram gemas (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D, 1E, 1F), inclusive, quando o extremo era proximal, na orientação vertical invertida, mostrando que o BAP induziu o estabelecimento da polaridade.

1.3. Em meio de cultura contendo TDZ (1,0 mg L⁻¹)

1.3.1. Morfogênese no extremo distal dos segmentos de hipocótilo

Neste extremo, pequena porcentagem de segmentos de hipocótilo apresentou respostas morfogênicas no meio de cultura contendo TDZ. Na orientação vertical normal, não houve intumescimento macroscópico, ao longo de todo o período de avaliação (Figura 1E). Apenas formou uma camada cicatricial na face cortada do explante, constituída de células pequenas de cor branca-esverdeada.

Na orientação horizontal, o intumescimento nesse extremo foi observado somente a partir dos 28 dias de incubação; intumescimento que se traduziu em calo verdadeiro a partir dos 35 dias de cultivo (36 %).

A orientação vertical invertida, mostrou um discreto intumescimento (em 27 %, apenas dos explantes), mesmo assim, somente a partir dos 21 dias de cultivo. Entretanto, a partir dos 28 dias, observou-se um rápido e vigoroso intumescimento, traduzindo-se em 100 % de explantes formando calo verdadeiro, aos 42 dias.

Comparando o extremo distal nas duas orientações (horizontal e vertical invertida), verificou-se que a frequência de explantes com formação de calo foi claramente superior na orientação vertical invertida. Comportamento ainda mais destacado ocorreu para o tamanho médio de calo, o que foi em média 11,6 mm² contra 22,13 mm². Essa maior atividade morfogênica dos explantes nessa orientação parece sugerir que na orientação vertical, é mais forte a magnitude da polaridade.

No referente à formação de gemas no extremo distal, estas se formaram, apenas quando os explantes foram cultivados na orientação horizontal, sendo o evento observado a partir dos 21 dias. A frequência de explantes que formaram gemas variou entre 26 e 78 %, com a média de gemas formadas por explante, variando entre 2,8 e 8,6.

Semelhante ao que ocorrera com os explantes na orientação vertical invertida, também na horizontal, quando não houve formação de calo, no referido extremo, houve formação de uma camada necrosada em sua face cortada. Fato também ocorrido nos tratamentos controle e com BAP. Na orientação horizontal, esta necrose ocorreu em toda a superfície do explante em contato com o meio de cultura; e a superfície, não em contato com o meio, assumiu uma coloração verde clara, além de apresentar rachaduras longitudinais profundas (Figuras 2A, 2B e 2C), com necrose do tecido periférico.

É importante verificar que, seguindo-se as linhas de separação do tecido morto e sadio dos explantes na orientação horizontal (Figura 1F) e de separação do calo e da parte aérea dos explantes na orientação vertical normal (Figuras 1E), houve formação de gemas vigorosas, em um processo organogênico, claramente ocorrido pela via direta.

Uma comparação dos meios sem citocininas e com BAP frente ao meio contendo TDZ mostra diferenças marcantes na resposta morfogênica dos segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro. Quando os explantes foram cultivados em meio contendo TDZ, gemas se formam em ambos extremos dos explantes e somente com os explantes cultivados na orientação horizontal. Essa resposta contrasta, de modo importante, com aquela dos explantes cultivados no meio controle e com o meio contendo BAP. Nestas condições, as orientações vertical normal e horizontal apresentam semelhante comportamento para formação de gemas no extremo distal, mas não para o extremo proximal dos explantes. Este extremo somente forma gemas nas orientações horizontal e vertical invertida. É interessante verificar que na orientação vertical invertida e na ausência de BAP, não houve formação de gemas em nenhum dos dois extremos.

As respostas morfogênicas destes três distintos tratamentos permitem verificar que apenas o BAP é capaz de induzir a polaridade, como o que ocorreu no extremo proximal dos explantes, cultivados na orientação vertical invertida. Como já discutido anteriormente, o BAP também ampliou o efeito da polaridade nas orientações vertical normal e horizontal, e de modo mais evidente, nesta última orientação. Isto se traduziu em uma maior eficiência na formação de gemas. Ademais, comparando os três meios, notou-se, em geral, uma resposta morfogênica mais retardada do TDZ, frente ao controle e ao BAP, independente da orientação do explante no meio de cultivo e do seu extremo fisiológico; embora na orientação horizontal, a média de gemas formadas por explante, no extremo distal, foi, em geral, similar à do BAP e maior frente à do controle. O TDZ, ao contrário do BAP desativou por completo a polaridade e, conseqüentemente, impediu a organogênese para gemas, não apenas no extremo distal, mas também no proximal dos segmentos hipocotiledonares, quando estes foram cultivados nas orientações vertical normal e vertical invertida.

Com relação ao intumescimento e formação de calo, uma comparação dos três meios mostrou que a frequência de explantes que intumesceram e formaram calo foi maior na presença de BAP, independentemente da orientação do explante no meio de cultivo e do extremo fisiológico, embora não para tamanho médio de calo que foi maior no meio com ausência de citocininas e com presença de TDZ.

1.3.2. Morfogênese no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo

Para o meio de cultura contendo TDZ, este extremo mostrou distintas respostas morfogênicas, segundo a orientação de cultivo dos explantes.

Apenas quando os explantes foram cultivados nas orientações vertical normal e horizontal, houve intumescimento deste extremo e formação de calo. Observou-se para estas duas variáveis, uma maior precocidade do processo morfogênico, quando os explantes foram cultivados na orientação vertical normal, a partir dos 14 dias. Também, nessa orientação, foi maior a frequência de extremos proximais intumescidos, variando de 20 a 84 %. E apenas 40 a 82 % dos extremos intumescidos se converteram em calo verdadeiro, sendo também claramente superior, o tamanho médio do calo (24,2 mm²). Na orientação horizontal, ambos os extremos dos explantes (distal e proximal) respondem positiva e concomitantemente ao intumescimento (média geral de 32 e 19,33 %, respectivamente) e calejamento (média geral de 38 e 33 %, respectivamente). Na orientação vertical invertida, apenas se formou na face cortada do mesmo, uma fina camada constituída por uma massa celular de aparência rugosa e mais ou menos friável. Esta característica nesse extremo e nessa orientação, difere daquelas, quando os explantes foram cultivados nos meios controle e com BAP.

Grande número dos calos formados na presença de TDZ apresentou rachaduras longitudinais (Figuras 1E, 1F, 2A, 2B e 2C). Na faixa de separação dos tecidos necrosado e sadio, comumente formavam-se gemas bastante vigorosas (Figura 1E), transparecendo uma organogênese direta. Os explantes, que não formaram calo, apresentaram uma camada superficial necrosada na face cortada deste extremo.

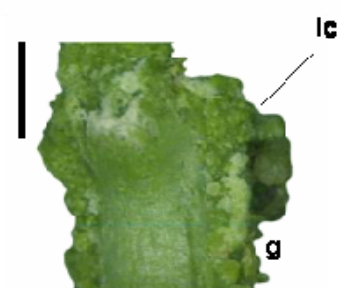
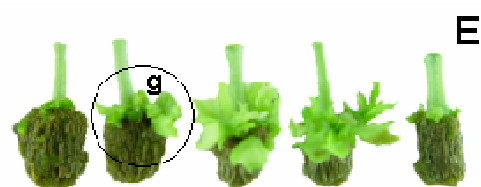
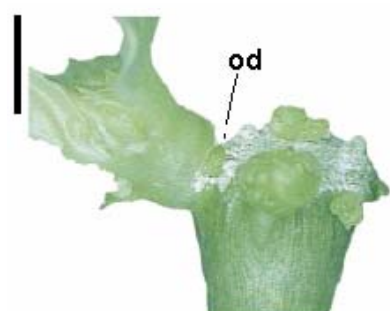
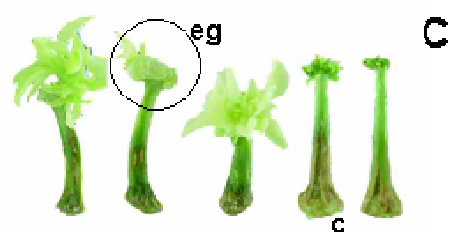
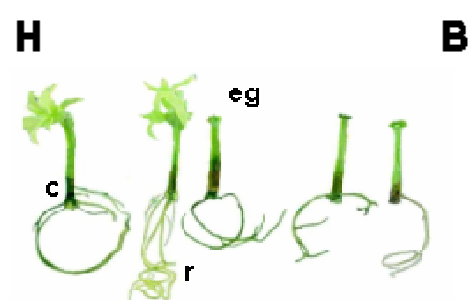
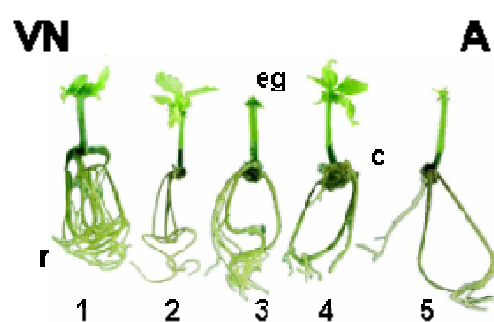
Com relação à formação de gemas no extremo proximal, como já havia ocorrido também, para o extremo distal, apenas houve resposta para os explantes cultivados na orientação horizontal, fato observado a partir dos 21 dias. A frequência de explantes que formaram gemas foi de 26; 44; 56 e 42 %, respectivamente nos

períodos de avaliação: 21; 28; 35 e 42 dias, com uma média de gemas por explante variando entre 2,8 e 4,3. Estes valores para gema são ligeiramente menores, se comparados com aqueles do extremo distal (2,8 e 8,6).

1.4. Influência da posição de retirada dos segmentos ao longo do eixo hipocotiledonar

Ao observar, em ambos os extremos, a influência da posição de retirada dos segmentos ao longo do eixo hipocotiledonar, constatou-se que não houve efeito da distância do segmento ao nó hipocotiledonar para as variáveis estudadas (comprimento de raiz, tamanho de calo e número de gemas). Portanto, não se estabeleceu um claro gradiente na resposta morfogênica. Assim, em termos práticos, torna-se viável a utilização de todos os segmentos hipocotiledonares no cultivo *in vitro* do maracujazeiro.

Figura 1A, B, C, D, E e F - Comportamento morfogênico, orientação vertical normal (**VN**) e orientação horizontal (**H**), de explantes hipocotiledonares (1, 2, 3, 4 e 5) de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*, cultivados em distintos meios de cultura e incubados durante 42 dias em sala de crescimento. Barra: 100 µm. **A e B.** Tratamento controle. **A.** Observa-se no extremo proximal, formação de calos (c) e raiz (r), e no extremo distal, estruturas organogênicas (gemas e brotos) (eg); **B.** Verifica-se no extremo proximal, formação de calos (c) e raiz (r), e no extremo distal, estruturas organogênicas (gemas e brotos) (eg). **C e D.** Tratamento com BAP. **C.** Observa-se, no extremo proximal, formação de calos (c), e no extremo distal, estruturas organogênicas (eg), por organogênese direta (od); **D.** Visualiza-se, em ambos extremos, estruturas organogênicas (gemas e brotos) (eg). **E e F.** Tratamento com TDZ. **E.** Verifica-se a formação de gemas (g) na linha de separação do calo (lc) com a parte aérea do explante; **F.** Observam-se ao longo de todo o explante formação de gemas (g) na linha de separação do tecido necrosado e sadio.



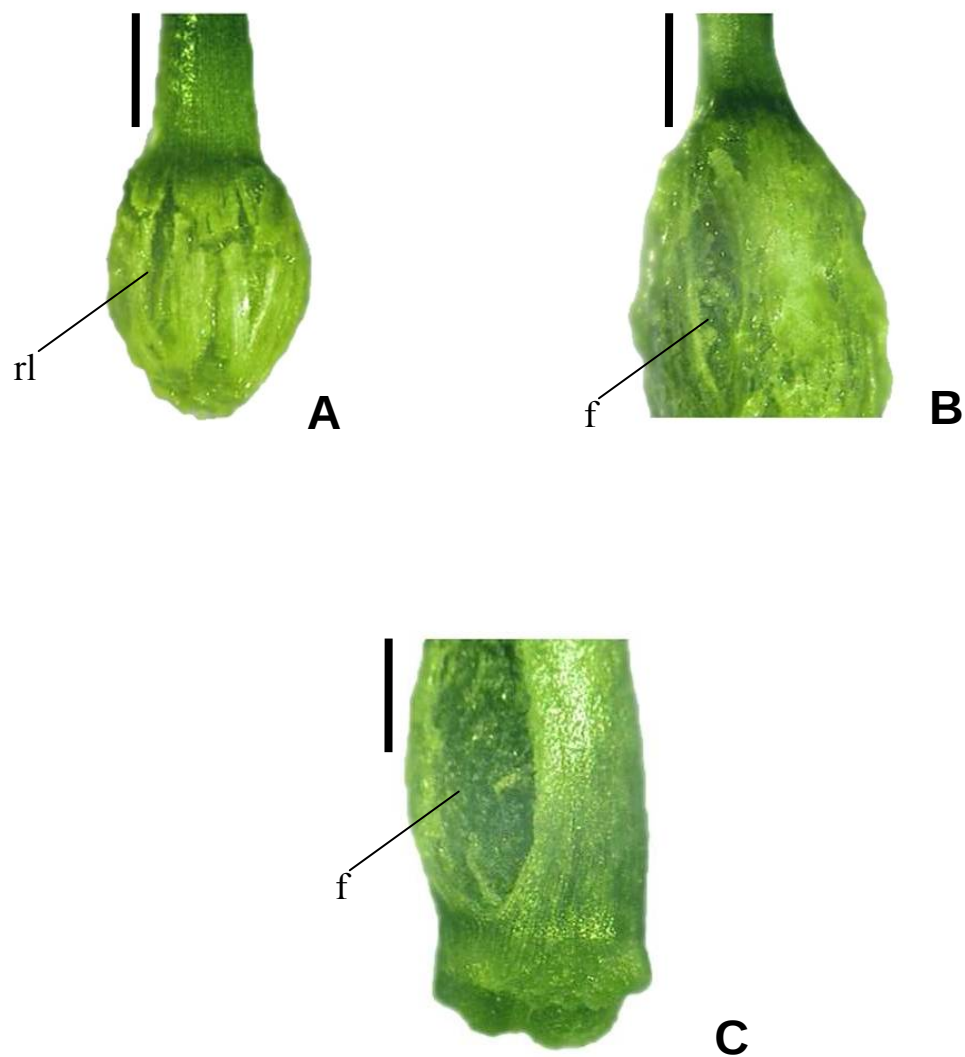


Figura 2A, B e C - Comportamento morfogênico de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*, cultivados na orientação vertical normal, em meio de cultura contendo TDZ, e incubados durante 42 dias em sala de crescimento. Barra: 100 μ m. **A.** Visualiza-se rachaduras longitudinais (rl). **B e C.** Observam-se profundas fissuras (f), resultantes da proliferação celular.

2. Análise estatística da resposta morfogênica em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro

Os resultados da resposta morfogênica dos segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro, analisados descritivamente no item anterior, mostram melhor repetibilidade e consistência das variáveis aos 42 dias de cultivo. Por essa razão, procedeu-se a análise estatística com base apenas no respectivo período de avaliação.

Os fatores estudados: citocininas e orientação dos segmentos hipocotiledonares no meio de cultura afetaram, significativamente, as variáveis tamanho de calo e número de gemas formadas, ao analisá-las com base nos extremos distal e proximal dos explantes. Os resumos das análises de variância se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo das análises de variância referentes ao tamanho de calos (mm²) e número de gemas formadas nos extremos distal e proximal de segmentos hipocotiledonar do maracujazeiro, em função da citocinina e da orientação dos segmentos no meio de cultivo.

F.V.	Quadrados Médios ⁽¹⁾				
	Extremos				
	Distal			Proximal	
	GL	Calo	Gema	Calo	Gema
Citocinina (C)	2	20,55 **	4,73 **	7,78 **	6,50 **
Orientação (O)	2	30,17 **	18,35 **	77,67 **	5,24 **
C x O	4	8,98 **	5,00 **	4,03 **	3,09 **
Erro	81	0,04	0,04	0,06	0,02
C.V.		9,71	11,02	7,26	10,02

1. * * - Significativo a 1 % de probabilidade.

2.1. Respostas morfogênicas no extremo distal dos segmentos hipocotiledonares

Ao analisar a interação entre os meios de cultivo com ausência (controle) e com presença de citocininas (TDZ e BAP), e a orientação dos explantes nesses meios, verifica-se que houve diferença estatística dos fatores para o tamanho de calo (Figuras 3A e 3B) e número de gemas (3C e 3D).

Na Figura 3A, observa-se o efeito da orientação na formação de calos nos referidos meios de cultura estudados. Os calos se formaram no extremo distal, apenas, quando os explantes foram cultivados nas orientações horizontal e vertical

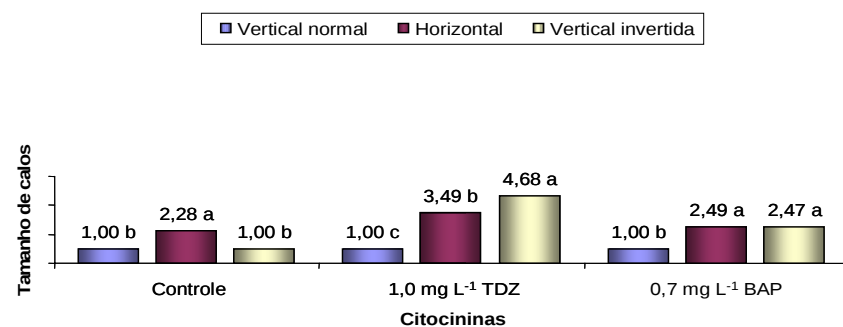
invertida. O efeito da orientação foi mais marcante, quando ao meio se adicionou TDZ.

Observa-se na Figura 3B, que houve efeito da citocinina para a formação de calos, quando os explantes foram cultivados nas referidas orientações. Apenas, quando os explantes foram cultivados em meios com presença de citocininas (TDZ e BAP), obteve-se os melhores resultados. O maior tamanho médio de calo foi obtido pelos explantes cultivados em meio de cultura contendo TDZ, nas orientações horizontal ($3,49 \text{ mm}^2$) e vertical invertida ($4,68 \text{ mm}^2$). Em ambas as orientações, o TDZ apresentou efeito superior aos demais meios de cultivo.

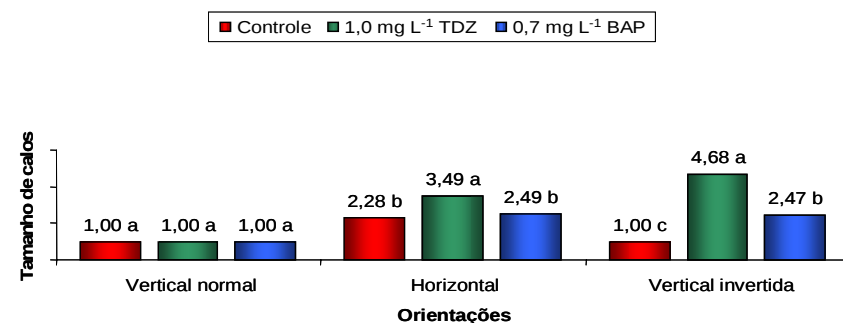
Na figura 3C, observa-se que as gemas se formaram no extremo distal, apenas, quando os explantes foram cultivados nas orientações vertical normal, nos meio de cultivo controle e com BAP, e na horizontal em todos os meios estudados. O efeito da orientação foi marcante quando os explantes foram cultivados na orientação vertical normal, independente do meio de cultivo.

Verifica-se na Figura 3D, que os maiores números de gemas foram obtidos, quando se cultivam os explantes na orientação vertical normal no meio de cultura contendo BAP (3,17 gemas por explante). Com relação ao TDZ, o maior número de gemas foi obtido na orientação horizontal (2,57 gemas por explante). Entretanto, as maiores médias, para número de gemas formadas nos explantes, foram obtidas quando se adicionou BAP ao meio de cultura, independentemente da orientação dos explantes nesse meio. No respectivo meio, observa-se que nas orientações horizontal e vertical normal, nessa ordem, apresentaram valores crescentes para esta variável, sendo, respectivamente de 2,78 e 3,17 gemas por explante.

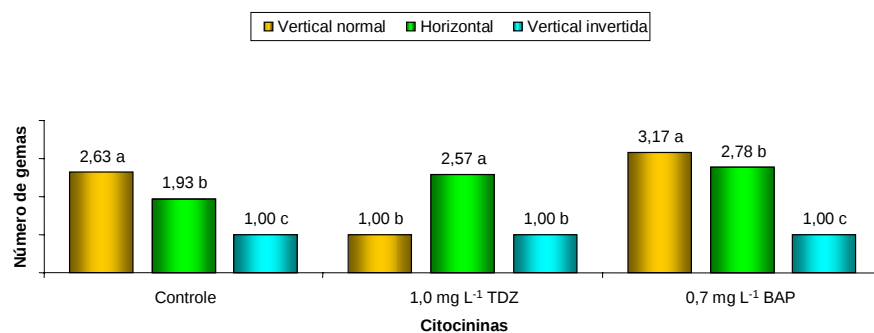
Figuras 3A, B, C e D - Valores médios para tamanho de calos (mm^2) e número de gemas formados no extremo distal dos segmentos hipocotiledonares, cultivados *in vitro*. **A e C.** em função da orientação; **B e D.** em função dos meios de cultura com ausência (controle) e na presença de citocininas (TDZ e BAP)¹.



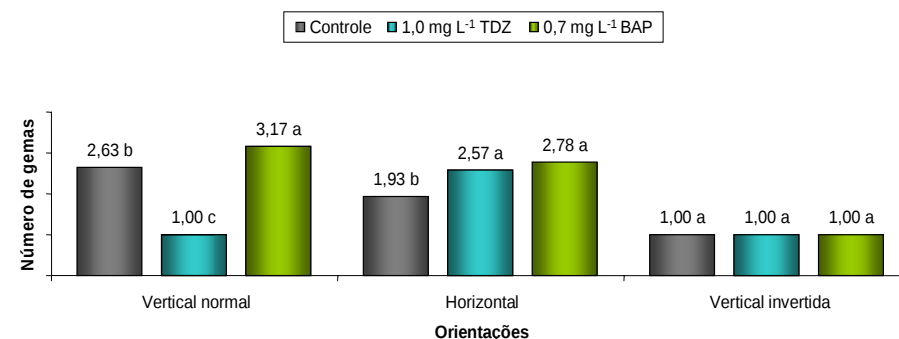
A



B



C



D

1. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas das mesmas letras, na orientação e na citocinina, não diferem, estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

2.2. Respostas morfogênicas no extremo proximal dos segmentos hypocotiledonares

Observa-se que houve diferença estatística, em função da orientação dos explantes nos respectivos meios de cultivo (Figuras 4A e 4B), e da natureza química da citocinina adicionada no meio de cultivo (4C e 4D).

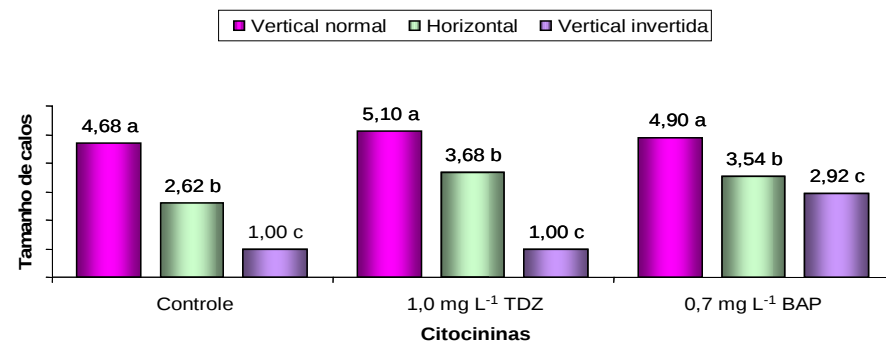
Com relação ao tamanho de calo, Figura 4A, constata-se que houve efeito da orientação dos explantes nos respectivos meios de cultivo. Os calos se formaram no extremo proximal, apenas, quando os explantes foram cultivados nas orientações vertical normal e horizontal no meio de cultivo controle, e contendo TDZ e BAP. O efeito da orientação foi mais significativo quando os explantes foram cultivados na orientação vertical normal, independentemente da ausência ou presença de citocinina no meio de cultivo.

Na Figura 4B, observa-se que as maiores médias foram alcançadas quando se adicionou citocininas ao meio de cultura, independentemente da orientação dos explantes no meio de cultivo. Constata-se que o extremo proximal foi mais responsivo com os explantes cultivados no meio de cultivo contendo TDZ (5,10 mm²) na orientação vertical normal.

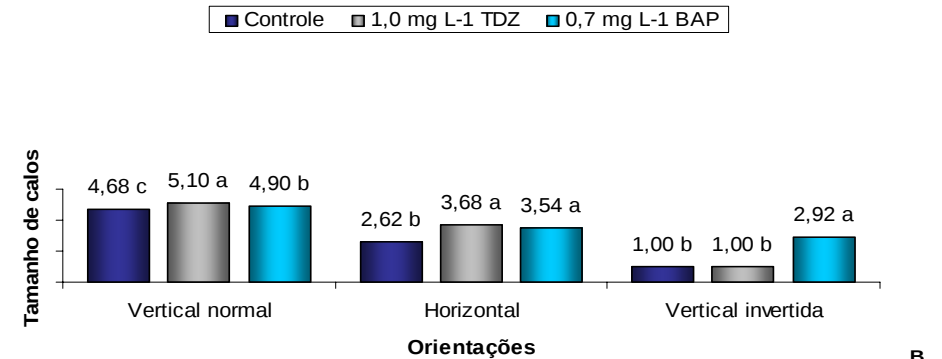
Analisando-se o número de gemas formadas (Figuras 4C), observa-se que esta variável foi dependente da orientação dos explantes no meio de cultivo. Constata-se, que o extremo proximal foi responsivo à formação de gemas na orientação horizontal, quando os explantes foram cultivados na presença, tanto de TDZ, como de BAP no meio de cultura. Na orientação vertical invertida, o extremo proximal formou gemas, tão somente, quando se adicionou BAP ao meio. Na orientação vertical normal, este extremo não respondeu à formação de gemas, em nenhum dos meios utilizados.

Verifica-se na Figura 4D, que os melhores resultados foram com os explantes cultivados na orientação horizontal, na presença, tanto de TDZ como de BAP no meio de cultura, formando, respectivamente, 2,10 e 2,28 gemas por explante. Na orientação vertical invertida, o extremo proximal formou gemas, tão somente, quando se adicionou BAP ao meio (2,50 gemas por explantes). Verifica-se, de novo, que o BAP apresentou efeito superior ao TDZ no número de gemas formadas.

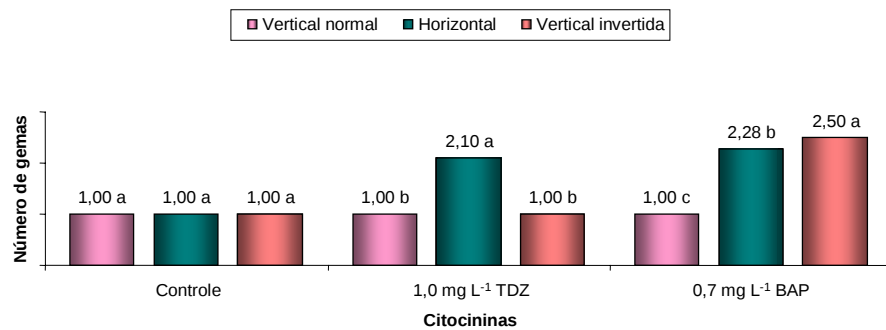
Figuras 4A, B, C e D - Valores médios para tamanho de calos (mm²) e número de gemas formados no extremo proximal dos segmentos hipocotiledonares, cultivados *in vitro*. **A e C.** em função da orientação; **B e D.** em função dos meios de cultura com ausência (controle) e na presença de citocininas (TDZ e BAP)¹.



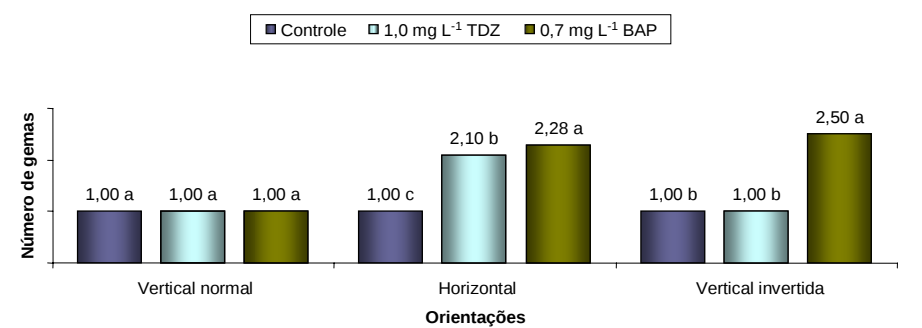
A



B



C



D

1. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas das mesmas letras, na orientação e na citocinina, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Ao se comparar os extremos distal e proximal, verifica-se que houve diferenças com relação à resposta morfogênica. Estas diferenças decorreram em função da natureza química da citocinina adicionada ao meio de cultura, e da orientação dos explantes nesses meios. Apenas no extremo proximal houve formação de raízes. Os maiores tamanhos de calo, em ambos extremos, foram obtidos na presença de TDZ, independente da orientação dos explantes no meio, mostrando, assim, a atuação do TDZ como inibidor do estabelecimento da polaridade fisiológica nos extremos dos explantes. No extremo distal houve maior formação de gemas, quando comparado ao extremo proximal. O efeito indutor do BAP na formação de gemas foi superior ao do TDZ.

Apenas o BAP foi capaz de induzir a formação de gemas nas três orientações dos explantes no meio de cultura. Observa-se ainda, que o número de gemas por explante no extremo distal foi marcadamente superior ao do extremo proximal, principalmente, ao adicionar citocininas ao meio de cultura, independentemente do modo de inserção (orientação) dos explantes no meio de cultura.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários trabalhos de cultura de células e tecidos vegetais com diferentes espécies do gênero *Passiflora* obtiveram êxito na formação de brotos *in vitro*, utilizando vários tipos de explantes (Moran Robles, 1978; Scorza e Janick, 1980; Kantharajah e Dodd, 1990; d'Utra Vaz et al., 1993; Faria e Segura, 1997; Couceiro, 2002). Apenas Couceiro (2002) estudou o efeito da orientação dos explantes no meio de cultura sobre a resposta morfogênica, porém utilizando diferentes concentrações de ANA e BAP. O presente estudo reveste-se de importância, por não ter-se encontrado na literatura revisada, trabalhos referentes à influência da polaridade na resposta morfogênica em segmentos do hipocótilo de maracujazeiro, cultivados em meios de cultura, contendo duas citocininas de natureza química diferente (TDZ e BAP), e com estes explantes cultivados em três orientações (vertical normal, horizontal, e vertical invertida) no meio de cultura.

Lamenta-se, portanto, não ter sido possível levantar trabalhos, nesta linha de pesquisa, que pudessem servir de base para confrontar os resultados deste trabalho.

No presente estudo, o efeito da polaridade foi estudado, separadamente da influência da posição do segmento (explante) no eixo hipocotiledonar, visto que, em relação à resposta morfogênica, não foram constatadas diferenças entre os cinco explantes de hipocótilo, ou seja, não se estabeleceu um gradiente morfogênico, em relação à distância dos segmentos do nó cotiledonar, para a formação de raiz, de calo e de gema. Conforme pode-se observar pelas Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F, a formação dessas estruturas se manteve, em geral, semelhante em todos os segmentos. Estas observações corroboram com os resultados obtidos por Couceiro (2002) ao trabalhar com explantes hipocotiledonares de maracujazeiro.

Com base na literatura consultada, Couceiro (2002) foi o primeiro a investigar a existência ou não de um gradiente para a capacidade morfogênica em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro *in vitro*, porém apenas o presente trabalho estuda o tema sob a influência de citocininas, físico-quimicamente distintas, e com os segmentos em três orientações no meio de cultivo. Embora o gradiente para respostas morfogênicas tenha sido relativamente bem investigado para segmentos de epicótilos de algumas espécies de *Citrus* (Burger e Hackett 1986; Hiramatsu et al., 1987; Sim et al., 1989; Goh et al., 1995; Moreira-Dias, 1998, 2000), o mesmo não se tem ocorrido para outras espécies vegetais, existindo uma quase completa carência de informações. No referente ao maracujazeiro, e conforme já mencionado acima, além do presente trabalho, apenas Bacarin (1988), Couceiro (2002) haviam, antes, investigado o tema.

Ao comparar os explantes cultivados, nas três orientações (vertical normal, horizontal e vertical invertida), nos meios de cultura com ausência (controle) e com presença de citocininas (TDZ e BAP), os resultados mostraram, com relação a formação de raízes e de calo, que a resposta morfogênica foi influenciada pela polaridade. Raízes se formaram, exclusivamente, no extremo proximal dos explantes e, ainda assim, quando estes foram cultivados, tão somente, nas orientações vertical normal e horizontal e, somente, em meios com ausência de citocininas. A aplicação de citocininas parece desativar a polaridade fisiológica para a rizogênese, mas não para a calogênese, nesse extremo. Este comportamento sugere que a adição de

citocininas rompe a relação citocinina/auxina favorável ao enraizamento adventício. Isto estaria de acordo com o postulado de Skoog e Miller (1957).

Comparando-se os extremos proximal e distal, nas três orientações, pode-se observar que o extremo proximal foi, morfogenicamente, mais responsivo do que o extremo distal. A resposta morfogênica dada pelos explantes sugere haver uma interação entre orientação do explante no meio de cultura e a polaridade fisiológica dos extremos dos segmentos de hipocótilo. Nesse sentido, verificou-se que raízes mais longas se formam no extremo proximal de explantes cultivados na orientação vertical normal, do que na orientação horizontal; e raízes não se formam na orientação vertical invertida. Constatou-se, também, uma diminuição do número de gemas formadas por explante, tanto pela organogênese direta, como pela via indireta, dependendo da orientação do explante no meio de cultura. Desta maneira, a formação de gemas no extremo distal dos explantes, cultivados no meio com ausência de citocininas, foi mais elevada na orientação vertical normal, do que na orientação horizontal. Por outro lado, a formação de gemas no extremo distal, pela via indireta, foi mais elevada em explantes cultivados horizontalmente do que em explantes cultivados na orientação vertical invertida, em todos os períodos de avaliação. Um efeito mais marcante da polaridade na morfogênese foi demonstrado pelo número mais elevado de gemas formadas a partir do calo no extremo distal, do que no calo do extremo proximal dos explantes cultivados horizontalmente.

De acordo com os resultados desse trabalho, de forma geral, a resposta morfogênica foi estritamente dependente da natureza química da citocinina adicionada ao meio de cultura. Resposta esta, associada e também dependente da orientação do explante no meio de cultura. A melhor demonstração disso ocorreu com a formação de gemas, as quais se formaram em maior número, no extremo distal, na presença do BAP e quando os explantes se cultivaram na orientação vertical normal, resultado também alcançado por Couceiro (2002). Ademais, a presença das duas classes de citocininas, no meio de cultura, antecipou o processo morfogênico em ambos os extremos dos segmentos hipocotiledonares.

É muito relevante considerar o fato de se formar estruturas morfogênicas em ambos extremos, quando os explantes são cultivados na orientação horizontal. Nesta orientação, os resultados sugerem que as gemas podem ter se formado pelas duas vias: organogênese direta e indireta. Não há uma explicação simples para a mudança

da via morfogênica, quando o extremo distal do explante está em contato com o meio de cultura. A explicação para a existência de ambas as vias morfogênicas em segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro pode estar relacionada com o fato de que, nesta posição, os dois extremos ficam em contato com o meio de cultivo, havendo conseqüentemente a mesma influência da concentração dos reguladores de crescimento nas duas extremidades (Davies, 1987; Couceiro, 2002).

Com relação à orientação vertical normal, as gemas que se formaram no extremo distal ocorreram por processo de organogênese direta (Figura 1B). Uma possível explicação para esta resposta morfogênica poderia basear-se na própria polaridade fisiológica (extremo), a qual é uma propriedade "interna" dos tecidos (Komissarov, 1969; Wareing e Phillips, 1975), pois se observa que, na orientação vertical normal, o extremo distal não estando em contato com o meio de cultura, o padrão morfogênico (na extremidade distal formam-se gemas e na extremidade proximal formam-se raízes) da planta não é afetado. Portanto, ambos extremos, não sofrem a mesma influência da concentração dos reguladores de crescimento do meio de cultura.

No presente estudo, a análise estatística da resposta morfogênica confirma que nos explantes hipocotiledonares de maracujazeiro cultivados em meio de cultura contendo BAP, se estabeleceu uma plena e clara polarização fisiológica dos extremos dos referidos explantes (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 4A, 4B, 4C e 4D). Portanto, a via morfogênica depende da orientação do explante no meio de cultura, bem como da presença e da natureza química da citocinina adicionada a esse meio. Os resultados do presente trabalho mostram que, ao se trabalhar com BAP, deve-se considerar a polaridade fisiológica (extremo) dos explantes, bem como a orientação do explante no meio de cultura, com vistas a alcançar uma resposta morfogênica específica. Resultado semelhante foi observado por Couceiro (2002).

Com relação ao TDZ, um fato relevante foi verificar que seu efeito indutor da morfogênese, nos extremos dos explantes em contato com o meio de cultura (Figuras 1E e 1F), foi independente do período de avaliação e da orientação do explante (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 4A, 4B, 4C e 4D) no referido meio de cultura.

Com relação ao processo calogênico, para o extremo distal, o maior tamanho de calo ocorreu com os explantes na orientação vertical invertida (Figura 3B), e para o extremo proximal, na orientação vertical normal (Figura 4B). Outro fato de

destaque sobre o TDZ, foi o calejamento de todo o explante na orientação horizontal (Figura 1F), sendo que, de modo geral, esse calejamento apresentou comportamento semelhante para todas as condições de cultivo analisadas e nos cinco explantes hipocotiledonares (Figuras 1E e 1F). Para a formação de calo, o TDZ apresentou efeito superior ao BAP. Com relação ao potencial morfogênico induzido pelo TDZ, verifica-se que o referido fitorregulador inibe o efeito da polaridade e da orientação do explante inserido no meio de cultivo.

Ao comparar os efeitos morfogênicos do TDZ com o do BAP, observa-se que o TDZ apresentou efeito inibitório para o processo rizogênico, semelhantemente ao do BAP, e efeito organogênico, inferior ao BAP, em ambos os extremos, independentemente do modo de inserção (orientação) dos explantes no meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Badzian et al. (1989) com *Brassia* e Malik e Saxena (1992) com *Lens culinaris*, ambos ao trabalharem com epicótilo de explantes obtidos de plantas germinadas e crescidas *in vitro*. Estes autores observaram que elevadas concentrações de TDZ inibiram o processo rizogênico e organogênico, e que a exposição prolongada a esta citocinina induziu a formação de calos e de raízes, todavia, sendo estas raquíticas, finas e esbranquiçadas. Os resultados alcançados por estes autores sobre a rizogênese induzida pelo TDZ contrariam os resultados deste trabalho, que, como mencionado anteriormente, inibiu, por completo, a formação de raízes em explantes de maracujazeiro. Segundo Zhang et al. (2001), a explicação para estas respostas morfogênicas pode estar relacionada aos vários aspectos da natureza complexa da atividade do TDZ.

Atualmente, o TDZ é conhecido como indutor morfogênico, atuando como um substituto de auxinas e citocininas, na organogênese e embriogênese em várias espécies (Murthy et al. 1998). Isto tem sido proposto, uma vez que a capacidade do TDZ em induzir resposta morfogênica parece estar relacionada aos níveis endógenos de fitorreguladores (Mok et al., 1982). Estes autores descrevem que a atividade citocinínica do TDZ é claramente superior à da zeatina. Segundo Mok et al. (1987), isto pode se dever ao fato do TDZ, possivelmente, atuar no mesmo sítio de ação, comum às citocininas de ocorrência natural nos vegetais; e/ou a capacidade do TDZ em estimular a biossíntese ou alterar o metabolismo das citocininas endógenas. Verifica-se também, que efeitos indiretos são atribuídos ao TDZ, tais como a acumulação de citocininas purínicas (Capelle et al., 1983; Thomas e Katterman,

1986) e/ou a inibição da atividade da citocinina oxidase (Kaminek e Armstrong, 1990).

A formação de estruturas morfogênicas (calos e gemas), na presença de TDZ, segundo Gill e Saxena (1992), indica que este fitorregulador pode participar do processo de biossíntese, não apenas das citocininas, mas também de outros reguladores de crescimento endógenos, sugerindo, inclusive, que a auxina pode ser sintetizada pela mediação do TDZ. Para este caso, os autores relatam que o modelo pode ser similar ao descrito para a biossíntese de citocininas mediada pelo TDZ, podendo, também, o TDZ inibir a degradação de auxinas endógenas. Estas conclusões são corroboradas por Murthy et al. (1995), ao trabalharem com *Arachis*, e por Mithilla et al. (2003), ao trabalhar com *Saintpaulia*, ao analisarem os níveis hormonais endógenos em explantes *in vitro*. Portanto, resultados obtidos, neste estudo, sobre a indução de estruturas morfogênicas em explantes de maracujazeiro, cultivados em meios contendo TDZ, realçam as evidências para o papel desta tiazoluréia na modulação do metabolismo de citocininas e auxina no processo morfogênico.

Ao se analisar o potencial do TDZ em induzir respostas morfogênicas, verifica-se um comportamento diferenciado, quanto a forma de atuação, ao comparar com os meios de cultura com ausência de citocininas e com BAP. Estas diferenças se baseiam nas observações visuais e no extremo em contato com o meio (Figuras 1E, 1F, 2A, 2B e 2C). O TDZ foi eficaz em induzir a formação de estruturas organogênicas, apenas no extremo do explante que estava em contato com o meio de cultura, e que as alterações na indução de resposta morfogênica, observadas nos explantes não são atribuídas à polaridade. Os resultados sugerem que o TDZ não apresenta os processos de translocação e acumulação, semelhante aos processos que ocorrem com o BAP (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F). A explicação para o comportamento do TDZ pode estar relacionada aos vários aspectos das propriedades e natureza complexa da atividade do TDZ.

Por outro lado, ao analisar a formação de gemas no extremo distal, observou-se que o TDZ apresentou efeito inferior ao BAP. As explicações para estes fatos podem estar relacionadas com o tipo de explante e/ou com a elevada concentração utilizada de TDZ. A segunda possibilidade parece ser a mais explicativa, pois com base na literatura, verifica-se que o TDZ tem apresentado potencial indutor para a

organogênese igual ou superior ao BAP, quando utilizado em concentrações inferiores ao BAP, em várias espécies (Murthy et al., 1998; Mok et al., 1982; Gill e Saxena, 1992; Mithilla et al., 2003). Portanto, se faz necessária a continuidade do estudo para a comprovação do potencial indutor morfogênico do TDZ em explantes do eixo hipocotiledonar do maracujazeiro.

Com base no exposto, observa-se que as propriedades atribuídas ao TDZ podem provocar alterações morfogênicas na região do explante que está em contato com o meio de cultura contendo esta substância e sugere, ademais, que estas alterações na indução da resposta morfogênica, não parecem relacionar-se decisivamente com a polaridade.

As respostas morfogênicas apresentadas pelos explantes cultivados em meio contendo BAP e TDZ mostram que a polaridade fisiológica (extremos) dos explantes pode ser alterada pela natureza química da citocinina e pela orientação do explante nesses meios de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, R. S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002:102.
- Baccarin, M.N.R.A. **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* sp.** Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1988:101.
- Badzian, T.; Fotyma-Kern, J.; Hennen, G. R.; Oglesby, P. The influence of 6-benzyladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassica actinophylla* Endl. cv. Amate shoot explants. **Acta Hort.**, 251:191-197; 1989.
- Burger, D. W.; Hackett, W.P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of *Citrus*. **Plant Sci.**, 43:229-232; 1986.

- Capelle, S. C.; Mok, D. W. S.; Kirchner, S. C.; Mok, M. C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiol.**, 73:796-802; 1983.
- Couceiro, A. M. **Organogênese in vitro em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo** (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002:95.
- d'Utra Vaz, F. B.; Santos A. V. P. dos; Manders, G., Cocking, E. C.; Davey, M. R.; Power, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Rep.**, 12:220-225; 1993
- Davies, P. J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1987: 681.
- Dolcet-Sanjuan, R.; Mok, D. W. S.; Mok, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Rep.**, 10:240-242; 1991.
- Einset, J. W.; Alexandre, J. H. Multiplication of *Syringa* varieties and species in tissue cultures. Proc. Intl. **Plant Prop. Soc.**, 34:628-636; 1984.
- Faria, J. L. C.; Segura, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, 32: 1276-1277; 1997.
- Gill, R.; Saxena, P. K. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. **Can. J. Bot.**, 70:1186-1192; 1992.
- Goh, C. J.; Sim, G. E.; Morales, C. L.; Loh, C. S. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 43:301-303; 1995.
- Gomes, F. P. **Curso de estatística experimental**. Livraria Nobel, Piracicaba, 1995:467.
- Gribaudo, I.; Fronda, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. **HortScience**, 26:1083; 1991.
- Hiramatsu, J.; Enomoto, S.; Oyama, K. Plant regeneration from epicotyl and root segments of trifoliate orange *Poncirus trifoliata*. **Plant Tiss. Cult. Letters**,

- 4:79-81; 1987.
- Huetteman, C. A.; Preece, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 33:105-119; 1993.
- Kaminek, M.; Armstrong, D. J. Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. **Plant Physiol.**, 93:1530-1538; 1990.
- Kantharajah, A. S.; Dodd, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit). **Ann. Bot.**, 65:337-369; 1990.
- Kefford, N. P.; Zwar, J. A.; Bruce, M. I. Antagonism of purine and urea cytokinin activities by derivatives of benzylurea, In: WIGHTMAN, E. & SETTERFIELD, G. (Eds.). **Biochemistry and physiology of plant growth substances**. Ottawa: Runge Press, 1968:61-69.
- Komissarov, D. A. **Biological Basis for the Propagation of Woody Plants by Cuttings**. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1969: 250p.
- Lima, M. M. de; Gonçalves, A. N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Sci. Forest.**, 53:49-56; 1998.
- Lu, C. -Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, 29:92-96; 1993.
- Malik, K. A.; Saxena, P. K. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). **Aust. J. Plant. Physiol.**, 19:731-40; 1992.
- Mante, S.; Scorza, R.; Cordts, J. M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 19:10-11; 1989.
- Mithila, J.; Hall, J. C.; Victor, J. M. R.; Saxena, P. K. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentration and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Plant Cell Rep.**, 21:408-414; 2003.
- Mok, M. C.; Mok, D. W. S. The metabolism of [¹⁴C] - thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiol. Plant.**, 65:427-432; 1985.
- Mok, M. C.; Mok, D. W. S.; Armstrong, D. J.; Shudo, K.; Isogai, Y.; Okamoto, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry** 21:1509-1511; 1982.

- Mok, M. C.; Mok, D. W. S.; Turner, J. E.; Mujer, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, 22:1194-1197; 1987.
- Moran Robles, M, J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, 33:693-699; 1978.
- Moran Robles, M. J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *Passiflora mollissima* Bailey en culture “in vitro”. **Turrialba**, 29:224-228; 1979.
- Moreira-Dias, J. M. **Organogenesis in vitro en segmentos de epicotilo de citrange troyer**. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 1998:317.
- Moreira-Dias, J. M.; Molina, R.V.; Bórdon, Y.; Guardiola, J.L; García-Luis, A. Direct and indirect organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirement and in their response to light. **Ann. Bot.**, 85:103-110; 2000.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, 15:473-497; 1962.
- Murthy, B. N. S.; Murch S. J.; Saxena P. K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, 34:267–275; 1998.
- Murthy, B. N. S.; Murch, S. J.; Saxena, P. K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiol. Plant.**, 94:268-276; 1995.
- Nakayama, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Rev. Facultad Agronomía**, 42:63-76; 1966.
- Otoni, W. C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1995:198.
- Preece, J. E.; Huettelman, C. A.; Ashby, W. C.; Roth, P. L. Micro-and cutting propagation of Silver Maple: 1 - results with adult and juvenile propagules. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, 116:142-148; 1991.

- Scorza, R.; Janick, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, 105:892-897; 1980.
- Sim, G. E.; Goh, C. J.; Soh, C. S. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco multiple bud formation from shoot and root explants in the presence in of 6-benzylaminopurine. **Plant Sci.**, 59:203-210; 1989.
- Skoog, F. Miller, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. **Soc. Exp. Bot.**, 11:118-140; 1957.
- Thomas, J. C. Katterman, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiol.**, 81:681-683; 1986.
- van Nieuwkerk, J. P.; Zimmerman R. H.; Fordham, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, 21:516-518; 1986.
- Vaz, R. L. A biotecnologia aplicada à fruticultura: necessidades e perspectivas potenciais. In: São José, A. R.; Ferreira, F. R.; Vaz, R. L. A. (Coords.). **A Cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP; 1991:241-247.
- Wareing, P. F.; Phillips, I. D. J. **The control of growth & differentiation in plants**. Pergamon Press, Oxford, 1975:303.
- White, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 2:231-244; 1951.
- Zang, C. L.; Chen, D. F.; Elliott, M. C.; Slater A. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 37:305-310; 2001.

CAPÍTULO 2

Influência da polaridade, da posição de extração de segmentos no hipocótilo e da orientação destes explantes no meio de cultura sobre o mecanismo de ação do TDZ e BAP na morfogênese *in vitro* do maracujazeiro

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da posição de extração de segmentos ao longo do eixo hipocotiledonar, da polaridade e da orientação destes explantes no meio de cultura sobre o mecanismo de ação do TDZ e do BAP na resposta morfogênica *in vitro* do maracujazeiro. Os segmentos foram extraídos, assepticamente, de plântulas obtidas *in vitro*, e cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de diferentes concentrações isoladas de TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina). Os cinco explantes hipocotiledonares de cada plântula, numerados de 1 a 5, e, nesta ordem, foram cultivados nos referidos meios, seguindo-se três orientações: a) orientação vertical normal; b) orientação horizontal, e c) orientação vertical invertida, em frasco de cultivo. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados e transferidos para sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As respostas morfogênicas dos distintos explantes hipocotiledonares foram avaliadas com base nas análises morfológica e histológica, aos 14 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 doses x 3 orientações x 5 segmentos x 2 extremos, com 10 repetições. Os cortes histológicos mostraram que a resposta morfogênica em segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro é dependente da presença e da natureza química das citocininas adicionadas ao meio de cultura; a presença de BAP no meio de cultivo promove o estabelecimento da polaridade fisiológica nos extremos dos segmentos hipocotiledonares. Essa polaridade não se estabeleceu na presença de TDZ. A orientação do explante no meio de cultura influencia o nível de resposta morfogênica do explante. A natureza química da citocinina, associada à orientação do explante no meio de cultura,

modifica a magnitude da polaridade. As comparações diretas com o BAP permitiram a elucidação da capacidade indutora e dos efeitos originais do TDZ na resposta morfogênica em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro. A análise da resposta morfogênica, com base na histologia, permite confirmar os resultados da morfologia externa com maior precisão e detalhamento. Não houve gradiente de resposta morfogênica entre os explantes, tomados, sequencialmente, ao longo do eixo hipocotiledonar. O presente estudo adiciona subsídios para o entendimento da polaridade e do mecanismo de ação do TDZ na morfogênese.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) é uma planta tipicamente tropical. O Brasil ocupa posição de destaque como um importante produtor mundial de maracujá amarelo, com condições edafoclimáticas adequadas ao seu cultivo. A importância do maracujazeiro está associada às qualidades alimentícias e farmacológicas de seus frutos. Estes são comercializados sob as formas de produtos elaborados e *in natura* (Aguiar e Santos 2001; Lorenzi e Matos 2002).

Apesar da franca e atual expansão da área cultivada com maracujazeiro, no Brasil, ainda é necessário solucionar vários problemas, sejam para atender as exigências da indústria, sejam para atender ao comércio da fruta *in natura*. Dentre os problemas, um dos mais sérios é a alogamia, característica que redunde em populações de plantas genotipicamente heterogêneas, implicando em uma desuniformidade cultural (Ruggiero 1991; Bruckner 1994; Lima et al. 1999). Portanto, se fazem necessários estudos para pontualizar tecnologias que possibilitem maiores produtividades e qualidade de produção. O uso de biotecnologias modernas poderá contribuir à cultura do maracujazeiro, disponibilizando plantas de qualidade superior e cujos frutos sejam compatíveis com as necessidades do mercado (Kantharajah e Dodd 1990). Nos últimos anos, publicaram-se importantes trabalhos de cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* em distintas espécies de *Passiflora*. Os trabalhos revisados mostram que o êxito dos cultivos *in vitro* não só depende dos

fatores inerentes ao tecido vegetal, como também das condições ambientais da sala de incubação e do meio de cultura. Neste particular, a adição de fitorreguladores ao meio exerce um papel crítico no processo. E os trabalhos mencionam a necessidade de tão somente adicionar citocininas no meio de cultivo, para se lograr o êxito esperado na resposta morfogênica, com vistas à formação de gemas e brotos, sendo a mais utilizada o BAP (6-Benzilaminopurina) (Moran Robles 1978; Kantharajah e Dodd 1990; Dornelas e Vieira 1994; Kawata et al. 1995; Faria e Segura 1997; Couceiro 2002). Talvez por esta importância das citocininas, é que, atualmente, trabalhos têm procurado investigar e comparar as propriedades das citocininas derivadas de adenina, com aquelas das citocininas derivadas das tidiazolurêas. Dentre estas, o TDZ é o composto a partir do qual essas propriedades têm sido mais investigadas. O TDZ tem-se apresentado mais estável e com maior potencial de indução morfogênica que o BAP, a zeatina, ou i^6Ade [$N^6-(\Delta^6$ -isopentil) adenina] na maioria das espécies, nas quais tem sido testado (Mok e Mok (1985); van Nieuwkerk et al. (1986); Lu (1993); Lima e Gonçalves (1998) e Murthy et al. 1998).

Dados desses trabalhos revelam, ademais, que a via morfogênica do material vegetal não é criticamente importante. Nesse sentido, um outro fator, não suficientemente explicado nesses trabalhos, e que poderia ser determinante para o êxito da resposta morfogênica *in vitro*, envolveria a orientação do explante no meio de cultura. Segundo Nick e Faruya (1992) e Paolicchi et al. (2002), o impacto do fator polaridade sobre o crescimento e desenvolvimento de estruturas vegetais pode ser significativamente modificado pela variação da orientação do explante cultivado *in vitro*. García-Luis et al. (1999), em *Citrus*, e Couceiro (2002), em *Passiflora*, demonstraram que a região do explante em contato com o meio de cultura determinou a via morfogênica. Nestes dois trabalhos, a região dos explantes em contato com o meio de cultura formou estruturas por via indireta, após a formação do calo; na parte do explante não em contato com o meio, a resposta morfogênica (organogênese) ocorreu por via direta. Moreira-Dias et al. (2000) demonstraram em *Citrus*, que as respostas morfogênicas direta e indireta diferiram em exigências a fitorreguladores.

Com relação ao cultivo *in vitro* do maracujazeiro, pouco se conhece acerca das características morfológica e fisiológica de células competentes, bem como da ação dos fitorreguladores. Isto evidencia a grande importância dos estudos histológicos,

com vistas ao entendimento, conhecimento e confirmação da técnica morfogênica adotada, e com vistas à determinação dos tipos celulares que vão dar origem às estruturas formadas *in vitro*.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da posição do explante ao longo do eixo hipocotiledonar, da polaridade fisiológica estabelecida nos extremos dos explantes e da orientação destes no meio de cultura sobre o potencial do TDZ e do BAP, como indutores do processo morfogênico em explantes hipocotiledonares; e comparar o efeito indutor do TDZ com o do BAP na resposta morfogênica, com base em análises morfológicas e histológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Foram utilizados, como explantes, segmentos hipocotiledonares, obtidos de plântulas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), germinadas e crescidas *in vitro*. As sementes foram extraídas de frutos maduros, obtidos de uma única planta e procedentes do Pomar da Universidade Federal de Viçosa. Após completa remoção do tegumento, mediante uso de uma mini-morsa (Couceiro 2002), as sementes foram desinfestadas com ácido hipocloroso a 0,5 % (v/v) por cinco minutos, seguidos de quatro enxaguaduras com água desionizada estéril, em tempos de 5, 10, 10 e 10 minutos, respectivamente; e, posteriormente inoculando as sementes, uma por tubo de ensaio (25 x 135 mm), contendo aproximadamente 10 mL de meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige e Skoog 1962) com adição de sacarose (3 %, p/v) e ágar ISO FAR[®] (0,8 %, p/v). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. Tais tubos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em grades metálicas e mantidos em câmara de cultivo à temperatura de 27 ± 2 °C, em escuro, por 20 dias.

De cada plântula estiolada, vigorosa, com hipocótilo retilíneo e comprimento mínimo de 7 cm, foram obtidos cinco segmentos hipocotiledonares (10 a 12 mm de

comprimento). Para se especificar a posição no eixo hipocotiledonar, os segmentos (explantes) foram numerados de 1 a 5, sendo 1, o mais próximo ao nó cotiledonar e o 5, o mais distante deste.

2. Condições de cultivo

Os explantes hipocotiledonares foram cultivados em meio contendo os minerais nutrientes de MS, com adição de sacarose (3 %, p/v), vitaminas de White (1951) e de duas citocininas: TDZ (tidiazuron, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) e BAP (6-Benzilaminopurina, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), respectivamente nas concentrações de: 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ e 0,0 e 0,7 mg L⁻¹, sem combinação entre as mesmas. Estas concentrações foram tomadas com base em trabalhos anteriores (dados não publicados). Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição de 0,7 % (p/v) de ágar (ISO FAR[®]) fundente. Em seguida, foram vertidos cerca de 30 mL de meio de cultivo em frascos de vidro, com capacidade volumétrica de 320 mL. A esterilização dos meios de cultivo foi realizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. Após esta operação, os explantes hipocotiledonares, numerados de 1 a 5 e nesta ordem, foram cultivados. Nesse cultivo, com base na polaridade fisiológica, os explantes foram inoculados no meio de cultura, seguindo-se três orientações: a) orientação vertical normal, onde aproximadamente 2 a 3 mm do extremo proximal dos explantes foram inseridos no meio de cultivo; b) orientação horizontal, em que os segmentos de hipocótilo foram colocados deitados sobre a superfície do meio, com o extremo distal voltado para o interior do frasco e o proximal voltado para o exterior, afastado 1,0 a 1,5 cm da parede do frasco; e c) orientação vertical invertida, onde aproximadamente 2 a 3 mm do extremo distal dos explantes foram inseridos no meio de cultivo. Cada tratamento constou de 10 repetições (10 frascos), com 5 explantes (um eixo hipocotiledonar) por frasco de cultivo. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]), e transferidos para sala de cultivo, dispostos em estantes, e incubados à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de 54 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes (OSRAM[®] 40 W, luz do dia), por 14 dias. Este período de incubação de apenas 14 dias foi tomado com base em trabalhos anteriores (não publicados), mostrando ser tempo suficiente para

ocorrer histologicamente, as alterações estruturais implicadas na morfogênese, tanto no extremo distal, como no extremo proximal dos explantes.

A resposta morfogênica ocorrida nos segmentos hipocotiledonares foi avaliada com base nas análises morfológica e histológica.

3. Análise morfológica

Esta foi realizada através de observações visuais, ao final dos quatorze³ dias do período de incubação, mediante o auxílio de lupa binocular (ZEISS®). Foram avaliadas as seguintes características: coloração, formação e tamanho dos calos (mm²). Considerou-se calo a estrutura, cuja proliferação celular nos extremos dos segmentos hipocotiledonares media mais de 2 mm de largura por 1 mm ou mais de altura. Proliferações com valores iguais ou inferiores a estes foram denominadas de intumescimento do extremo. A medição do tamanho do intumescimento ou calo foi realizada através de papel milimetrado.

4. Análise histológica

Para os estudos de histologia, foram analisados os segmentos hipocotiledonares (explantes) tomados da posição 1, da posição 3 e da posição 5, a partir do nó hipocotiledonar, nas três orientações. A seleção apenas dos explantes nestas três posições, se baseou nos resultados da análise morfológica e da análise histológica de ensaio anterior, em que foram analisados os 5 explantes hipocotiledonares, cultivados sob influência dos mesmos tratamentos citocinínicos, explantes com a mesma distância do nó hipocotiledonar e extremos dos explantes, nas três orientações. Estas análises acusaram umas alterações morfogênicas semelhantes em cada um dos extremos, para os 5 explantes. Assim, foram selecionados os explantes de número 1, 3 e 5, em razão de ocuparem posições equidistantes no eixo hipocotiledonar.

Após o período de 14 dias de incubação, de cada um dos 3 tratamentos citocinínicos (controle, com BAP e TDZ) e das 3 orientações (vertical normal, horizontal e vertical invertida) tomou-se os 10 explantes da posição 1, os 10 explantes da posição 3 e os 10 explantes da posição 5 do eixo hipocotiledonar. Dos

³ As análises morfológicas e histológicas foram realizadas aos 14 dias, porque é quando já se observa a formação visível de estruturas, tais como calos, gemas e raízes.

explantes de cada posição, foram coletadas, separadamente, as estruturas cologênicas, formadas nos seus dois extremos (proximal e distal) para a realização das análises histológicas. Após a coleta, foram imediatamente fixadas em FAA₅₀ (formaldeído: ácido acético glacial: etanol 50 %; 5: 5: 90, v: v: v), por um período de 24 horas. Passado esse tempo, foram estocadas em etanol 70 % (v/v), até o momento de sua utilização. Posteriormente, foram desidratadas em série butílica terciária e incluídas em parafina + cera (Johansen 1940). Secções longitudinais (11 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo SPENCER-820[®], e colocadas em lâminas histológicas. Após desparafinização e hidratação em série xilólica / etílica, os cortes seriados foram corados com fucsina básica a 1 % [etanol 50 % (v/v) (Roeser 1972)] e azul de astra a 0,5 % [em ácido tartárico a 2 % (Roeser 1972)]. Assim tratados, os cortes foram montados entre lâminas e lamínulas, com bálsamo do Canadá. As imagens digitalizadas para análises foram obtidas em um microscópio de luz (OLYMPUS AX-70[®]), utilizando-se o programa IMAGE PRO-PLUS[®].

5. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 3 x 3 (citocininas x orientações x segmentos), com 10 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de cultivo contendo 5 segmentos, extraídos do eixo hipocotiledonar de uma plântula, a partir do nó.

RESULTADOS

1. Análise morfológica

1.1. Influência da orientação do explante na resposta morfogênica

Ao final dos 14 dias de incubação, observou-se que a orientação dos explantes no meio de cultura afetou o modelo de resposta morfogênica dos mesmos. E que o efeito desta orientação e a intensidade de resposta foram dependentes da natureza química das duas citocininas utilizadas, conforme descrito à continuação.

1.2. Influência da aplicação de reguladores de crescimento na resposta morfogênica

Em meios de cultura com ausência de citocininas (controle), ao final do período de incubação, não houve qualquer resposta morfogênica visível no extremo distal dos explantes, independente da orientação destes no meio de cultura. No referente ao extremo proximal, apenas os explantes cultivados nas orientações vertical normal e horizontal produziram um intumescimento desse extremo, ainda que discreto.

Em meios contendo BAP, já aos sete dias de incubação, podia-se observar, como resposta morfogênica, visível intumescimento do extremo proximal dos explantes, nos três modos de orientação destes no meio de cultura. Já no extremo distal destes explantes, não se observou intumescimento aparente, mesmo ao final do período de incubação (14 dias), exceto quando os explantes foram cultivados na orientação vertical invertida, em que houve intumescimento deste extremo, embora bastante discreto. É interessante salientar que, aos 14 dias, o extremo proximal (em contato com o meio de cultivo) daqueles explantes cultivados na orientação vertical normal e que não formavam calo, mostraram uma fina camada superficial de cor amarelada. Nas orientações vertical invertida e horizontal (extremo não inserido no meio) formou-se na face cortada do extremo, uma fina camada cicatricial, constituída de células pequenas, coloração branco gelo. Esse comportamento do extremo proximal nas três orientações de cultivo, foi em tudo semelhante àquele observado para esse extremo, quando os explantes foram cultivados em meio com ausência de citocinina (controle), exceto que, para este último tratamento, o referido extremo não formou a camada superficial de coloração amarelada, quando estava em contato direto com o meio de cultura.

Em meios de cultivo contendo TDZ, houve intensa atividade mitótica nos dois extremos dos explantes. Entretanto, quando estes foram cultivados nas orientações verticais normal e invertida não houve qualquer resposta morfogênica visível, nos dois extremos. Apenas quando os explantes foram cultivados na orientação horizontal, é que se observou o intumescimento dos extremos dos explantes, sendo o mesmo bastante discreto no extremo distal e bastante marcante no extremo proximal.

Esse comportamento do extremo proximal dos explantes evidencia uma maior precocidade e maior atividade mitótica de suas células. Essas observações tomadas

aos 14 dias de incubação revelam que a magnitude da polaridade dos segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro pode ser modificada em função da orientação do explante no meio de cultura, associada à natureza química das citocininas usadas.

1.3. Influência da posição do explante no eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica

Após os 14 dias de incubação, ao avaliar a influência da posição de extração do explante ao longo do eixo hipocotiledonar, verificou-se não haver gradiente de resposta morfogênica entre os 5 explantes. Estes apresentaram, ente si, características morfológicas similares, independentemente dos tratamentos, orientações no meio de cultivo e posição do explante, ao longo do eixo hipocotiledonar testados.

1.4. Análise histológica

Os cortes histológicos seriados permitiram observar alterações estruturais nos extremos proximal e distal, aos 14 dias do cultivo dos explantes hipocotiledonares.

Ao se cultivar os explantes em meios desprovidos de citocininas, as alterações estruturais ocorridas nos seus extremos em contato com o meio de cultura, nas três orientações (Figuras 1A, 2A, 2B e 3B) evidenciam uma região alterada, na qual foi possível detectar intensa atividade mitótica, com divisões anticlinais e periclinais na base desses extremos, e a presença do procâmbio e região meristemática. Uma comparação desses extremos mostra que no extremo distal (Figuras 1B, 2B e 3B), a atividade mitótica foi de menor intensidade, resultando em menor proliferação celular e uma região menos desenvolvida, se comparado com o extremo proximal (Figuras 1A, 2A e 3A).

No tratamento controle, agora, para aqueles extremos dos explantes que não entraram em contato com o meio de cultura: orientação vertical normal (extremo distal) (Figura 1B) e vertical invertida (extremo proximal) (Figura 3A), os cortes histológicos mostraram uma proliferação celular nesses dois extremos, sendo esta proliferação mais intensa no extremo distal (Figura 1B). Por esta figura, além da proliferação celular, se pode observar, no extremo distal, formações iniciais de estruturas organogênicas, com comunicação direta com o procâmbio.

Quando os explantes foram cultivados em meio de cultura contendo BAP, as

alterações estruturais ocorridas nos extremos em contato com o meio de cultura, nas três orientações (Figuras 1C, 2C, 2D e 3D), seguiram um padrão semelhante àquele das alterações visualizadas no tratamento controle. Para esta condição dos extremos, ao comparar os dois extremos proximais (Figuras 1C e 2C) com os dois distais (Figuras 2D e 3D), verifica-se que os proximais, de novo, apresentaram maior atividade mitótica, resultando em uma região com maior proliferação celular, sendo, por isso, mais desenvolvida. Em nenhum dos quatro extremos, foram observadas estruturas organogênicas ou embriogênicas, fato também observado, quando o meio era desprovido de citocinina.

Comparando-se os extremos que não estavam em contato com o meio de cultura: extremo distal, na orientação vertical normal (Figura 1D) e extremo proximal, na orientação vertical invertida (Figura 3C), observa-se, a partir dos cortes histológicos, uma proliferação celular, nestes dois extremos. Entretanto, esta se mostrou mais intensa no extremo distal (Figura 1D), fato também constatado para estes extremos no meio com ausência de citocinina. Com relação a este extremo distal, além da proliferação celular, se observou, também, formações iniciais de estruturas organogênicas, tendo estas, comunicação direta com o procâmbio, fato já constatado anteriormente, quando os explantes foram cultivados na ausência de citocininas.

Em meios de cultivos com ausência de citocininas ou com presença de BAP, se estabeleceu uma plena e clara bipolarização dos extremos dos segmentos hipocotiledonares. Para aqueles extremos que ficaram em contato com os referidos meios, as alterações estruturais foram mais precoces e intensas no extremo proximal. Para aqueles extremos que não entraram em contato com o meio, as alterações foram mais intensas e precoces no extremo distal. Portanto, o modo pelo qual o explante é inserido no meio de cultura (orientação do explante) parece influenciar o nível de resposta morfogênica do explante. Com relação às alterações estruturais e atividade mitótica, estas foram mais marcantes nos explantes inseridos no meio de cultura com BAP.

Nos explantes cultivados em meio de cultura contendo TDZ, verifica-se que os extremos em contato com o meio de cultura, nas três orientações (Figuras 1E, 2E, 2F e 3F), as alterações estruturais, seguiram padrão semelhante àquelas ocorridas nos tratamentos controle (Figuras 1A, 2A, 2B e 3B) e com BAP (Figuras 1C, 2C, 2D e 3D), porém diferenças marcantes foram observadas com relação à atividade mitótica. Nessa condição, observou-se maior intensidade da atividade mitótica, resultando em células de conformação regular e formando regiões meristemáticas, que deram origem a meristemóides, constituídos por células pequenas, com citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 3F). Pode-se constatar, também, protusões (Figuras 1E, 2E, 2F e 3F) e estruturas organogênicas (Figura 2E e 2F) na periferia do calo, sugerindo uma organogênese indireta. Ao comparar os dois extremos proximais (Figuras 1E, 2E), com os dois distais (Figura 2F e 3F), verifica-se não haver diferenças estruturais entre os quatro extremos.

Com relação aos extremos que não estavam em contato com o meio de cultura: orientações vertical normal (Figura 2F) e vertical invertida (Figura 3E), pode-se constatar, através dos cortes histológicos, uma proliferação celular mais intensa no extremo proximal do que no distal. Neste extremo observou-se pequena região celular (Figura 1F). Em nenhum dos dois extremos foram observadas estruturas organogênicas.

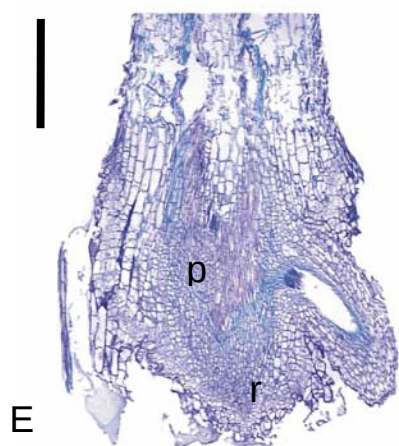
Em meio de cultivo com presença de TDZ, ao se comparar com os meios com ausência de citocininas ou com presença de BAP, não se observou clara bipolarização dos extremos dos segmentos hipocotiledonares, como observado nos demais meios de cultura. No meio com TDZ, as alterações estruturais foram mais precoces e intensas nos extremos em contato com o meio de cultura; e para aqueles extremos que não entraram em contato com o meio, não houve diferenças em relação às alterações estruturais e atividade mitótica. Portanto, o modo pelo qual o explante é inserido no meio de cultura (orientação do explante) não parece influenciar o nível de resposta morfogênica do explante, no meio contendo TDZ.

1.5. Influência da posição do explante ao longo do eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica

No referente à posição de extração do explante ao longo do eixo hipocotiledonar, os cortes histológicos seriados, após os 14 dias de incubação, mostraram não haver

gradiente de resposta morfogênica entre os explantes testados. Estes apresentaram, entre si, características estruturais similares, independentemente dos tratamentos citocinínicos, orientações no meio de cultivo e posição do explante ao longo do eixo hipocotiledonar. O não estabelecimento desse gradiente já havia sido detectado, anteriormente, na análise morfológica. Esse comportamento mostra que, nos cultivos *in vitro*, pode-se utilizar todos os segmentos hipocotiledonares de plântulas do maracujazeiro.

Figura 1A, B, C, D, E e F - Corte histológico longitudinal, extremos proximal (**EP**) e distal (**ED**), de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura na orientação vertical normal, e incubados durante 14 dias em sala de crescimento. Barra: 100 µm. **A e B**. Tratamento controle. **A**. Observa-se formação do calo, derivado das atividades do procâmbio (pc) e região meristemática (rm); **B**. Verifica-se estruturas semelhantes às aquelas visualizadas no extremo proximal, procâmbio (pc), região meristemática (rm) e estrutura organogênica (eg); **C e D**. Tratamento com BAP: em ambos os extremos, observa-se que as alterações estruturais seguiram padrão semelhante àquele visualizado no tratamento controle, procâmbio (pc) e região meristemática (rm); **D**. Observa-se formações iniciais de estruturas organogênicas, com comunicação direta com o procâmbio (seta); **E e F**. Tratamento com TDZ. **E**. visualiza-se intensa atividade mitótica na superfície do calo (seta), resultando em células de conformação regulares, formando regiões meristemáticas (rm), sendo possível verificar pequenas protusões (pr) na periferia do calo; **F**. observa-se pequena região celular (seta).



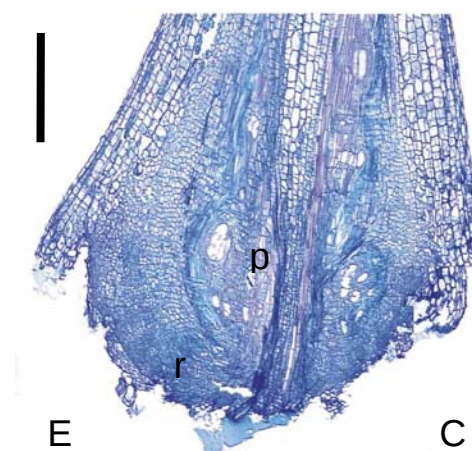
E

A



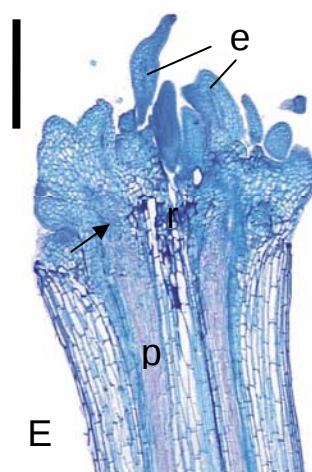
E

B



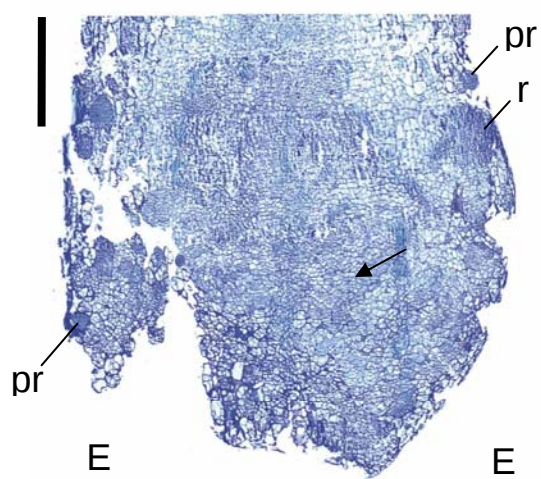
E

C



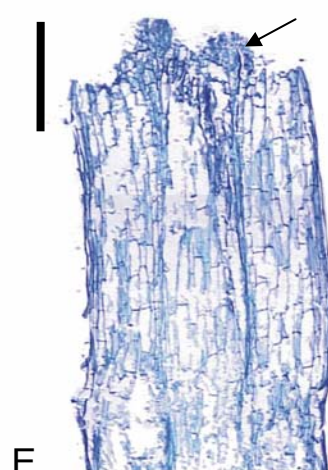
E

D



E

E



E

F

Figura 2A, B, C, D, E e F - Corte histológico longitudinal, evidenciando-se os extremos proximal (**EP**) e distal (**ED**), de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura na orientação horizontal, e incubados durante 14 dias em sala de crescimento. Barra: 100 µm. **A e B.** Tratamento controle: observa-se formação do calo, em ambos extremos, com padrão semelhante àquele da orientação vertical, visualizando-se a formação do calo, derivado das atividades do procâmbio (pc) e região meristemática (rm); **C e D.** Tratamento com BAP: observa-se que a formação do calo seguiu padrão semelhante àquele das alterações estruturais visualizadas no tratamento controle, procâmbio (pc) e região meristemática (rm); **E e F.** Tratamento com TDZ: visualiza-se intensa atividade mitótica na superfície do calo (seta), em ambos extremos, resultando em células de conformação regulares, formando regiões meristemáticas (rm), sendo possível verificar protusões (pr), estrutura organogênica (eg) formada a partir da proliferação celular na periferia do calo, evidenciando-se conexão vascular (cv).

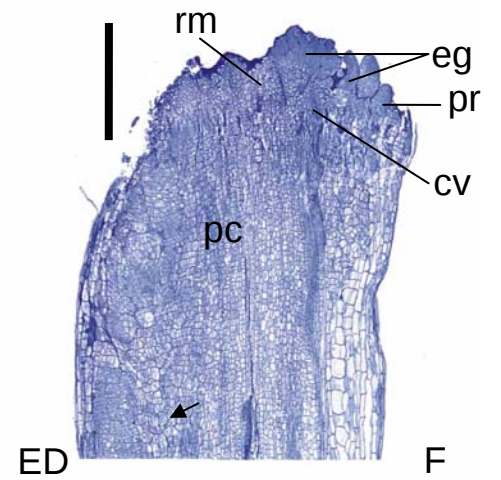
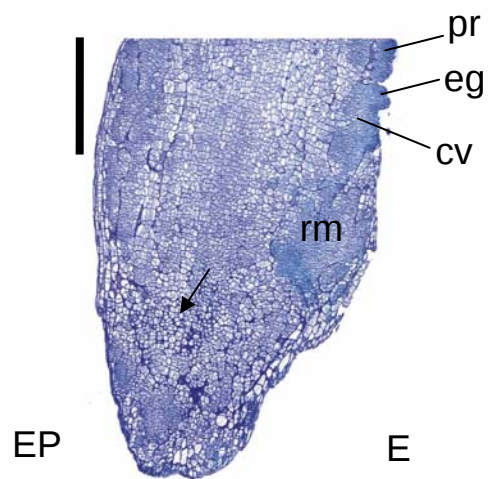
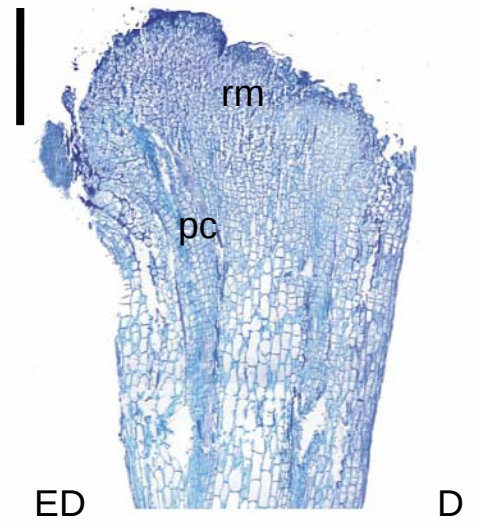
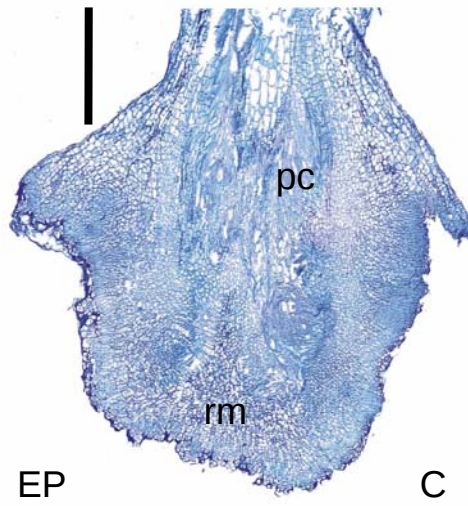
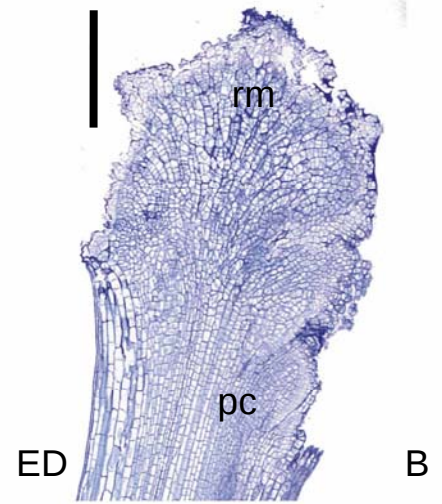
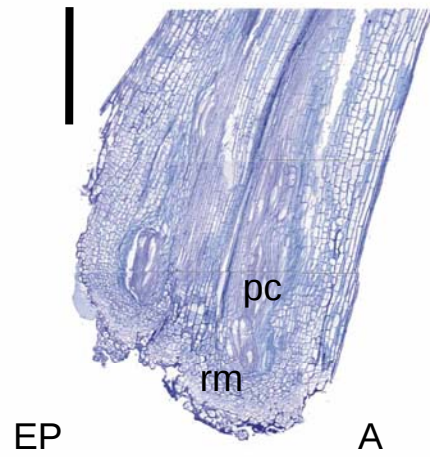
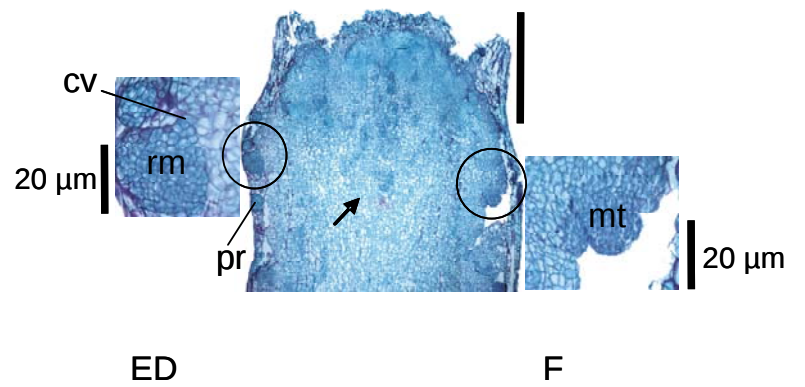
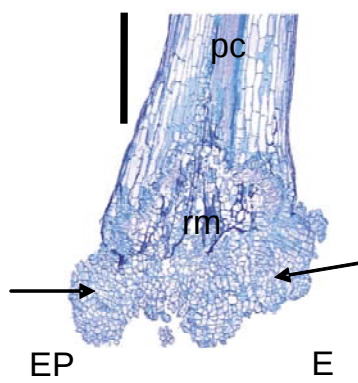
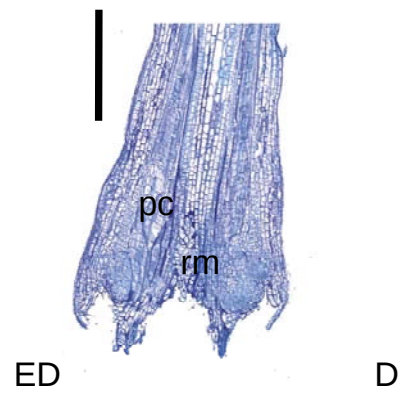
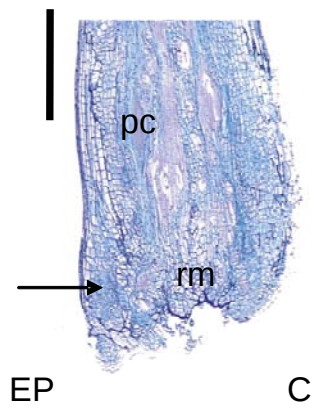
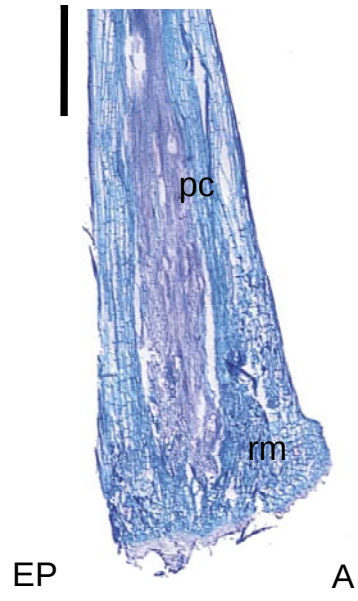


Figura 3A, B, C, D, E e F - Corte histológico longitudinal, evidenciando-se os extremos proximal (**EP**) e distal (**ED**), de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura na orientação vertical invertida, e incubados durante 14 dias em sala de crescimento. Barra: 100 µm. **A e B**. Tratamento controle: em ambos extremos, observa-se procâmbio (pc) e região meristemática (rm). **B**. Observa-se intumescimento do extremo (seta); **C e D**. Tratamento com BAP: observa-se que a formação do calo seguiu padrão semelhante àquele das alterações estruturais visualizadas no tratamento controle, visualizando-se procâmbio (pc) e região meristemática (rm). **D**. Verifica-se intumescimento do extremo (seta); **E e F**. Tratamento com TDZ: visualiza-se intensa divisão mitótica (seta); **E**. Observa-se estruturas semelhantes àquelas do tratamento controle, visualizando-se procâmbio (pc) e região meristemática (rm) e intensa proliferação celular na extremidade do explante (seta). **F**. Na superfície do calo verifica-se intensa atividade mitótica (seta), resultando em células de conformação regular, evidenciando-se conexão vascular (cv) e meristemóides (mt).



DISCUSSÃO

Neste estudo, as influências da orientação dos explantes no meio de cultura e da polaridade fisiológica foram analisadas em separado da influência da posição de extração do explante ao longo do eixo hipocotiledonar, em razão dos cortes histológicos mostrarem que a formação dos calos seguiu o mesmo padrão estrutural em todos os explantes, independentemente da orientação destes nos meios de cultura contendo as duas distintas citocininas (TDZ ou BAP).

Os resultados apresentados com base nas análises histológicas, mostraram para o período de incubação adotado, que a formação de calo (intumescimento) nos extremos dos explantes nas três orientações: vertical normal (Figuras 1A, 1C e 1E), horizontal (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E e 2F) e vertical invertida (Figuras, 3B, 3D e 3F), não foi influenciada pela presença de citocininas no meio de cultura; e sim, pelo contato do extremo do explante com o meio, independentemente de sua orientação nesse meio. É relevante relatar que, quando os explantes são cultivados horizontalmente sobre o meio de cultura, a formação de estruturas calogênicas se dá em ambos extremos. A hipótese para explicar tal comportamento, é que nesta posição os dois extremos ficam em contato com o meio de cultura, havendo conseqüentemente a mesma influência dos fitorreguladores exógenos nas duas extremidades do explante (Davies 1987; Couceiro 2002).

Com relação à formação de estruturas organogênicas, observa-se nos tratamentos contendo BAP (Figura 1D), que estas estruturas se formaram, por via direta, somente no extremo distal e quando os explantes se cultivam na orientação vertical normal. Esta via morfogênica, nesse mesmo tipo de explante de maracujazeiro, já havia sido descrita anteriormente por Couceiro (2002). Uma possível explicação para esta resposta morfogênica poderia basear-se na polaridade fisiológica, a qual é segundo Komissarov (1969) e Wareing e Phillips (1975), uma propriedade "interna" dos tecidos. Observa que na orientação vertical normal (Figuras 1C e 1D), o extremo distal (Figura 1D) que não está em contato com o meio de cultura, forma gemas; e o extremo proximal (em contato direto com o meio de cultura) forma, supostamente, raízes. Portanto, ambos extremos, não sofrem a mesma influência da concentração dos reguladores de crescimento do meio, e, desta forma, o padrão morfogênico do explante, não parece ser afetado.

O presente estudo confirma para explantes hipocotiledonares de maracujazeiro, cultivados em meio de cultura contendo BAP, que a via morfogênica depende da orientação do explante. Portanto, ao se trabalhar com BAP, deve-se considerar a polaridade fisiológica (extremo) dos explantes, bem como a orientação do explante no meio de cultura, com vistas a alcançar uma resposta morfogênica específica. Resultado semelhante foi observado por Couceiro (2002).

No tratamento contendo TDZ, ao se analisar os extremos em contato com o meio de cultura, nas três orientações (Figuras 1E, 2E, 2F e 3F), observa-se que os extremos apresentaram respostas morfogênicas semelhantes, independentemente da orientação no meio de cultura. Os extremos, nesta condição, apresentaram intensa divisão celular e formação de estruturas organogênicas no calo formado. Estas alterações estruturais não foram detectadas nos extremos fora de contato com o meio de cultura (Figuras 1F e 3E), fato este, também ocorrido, quando os explantes foram cultivados em meios com ausência de citocininas (controle) ou contendo BAP.

Ainda com relação ao TDZ, pode-se observar neste estudo, que seu potencial para induzir a morfogênese apresentou diferenças marcantes, ao comparar com os tratamentos controle e com BAP. O mecanismo de ação do TDZ é descrito como sendo dependente dos vários aspectos da natureza complexa de sua atividade (Zhang et al. 2001). Originalmente, o TDZ foi utilizado como desfolhante do algodoeiro, sendo, recentemente, incorporado aos cultivos *in vitro*, como indutor morfogênico, atuando como um substituto de auxinas e citocininas, na organogênese e embriogênese em várias espécies (Murthy et al. 1998). Tem sido proposto que a capacidade do TDZ em induzir respostas morfogênicas parece relacionar-se aos níveis endógenos de fitorreguladores (Mok et al., 1982). Estes autores descrevem que a atividade citocinínica do TDZ é claramente superior à da zeatina. Segundo Mok et al. (1987), isto pode se dever ao fato do TDZ, possivelmente, atuar no mesmo local de ação, comum às citocininas de ocorrência natural nos vegetais; e/ou a capacidade do TDZ em estimular a biossíntese ou alterar o metabolismo das citocininas endógenas.

A habilidade do TDZ em promover divisão celular e estimular o crescimento de tecidos se deve, em parte, a sua atividade citocinínica. Esta atividade fica concretizada pela presença de estruturas, em diferentes estádios de desenvolvimento, em um mesmo explante hipocotiledonar de maracujazeiro (Figura 1E, 2E, 2F e 3F),

evidenciando que o maracujazeiro apresenta um processo assincrônico de organogênese *in vitro*. Uma hipótese para se explicar esse processo seria de que os eventos que sucedem nos tratamentos com TDZ, ocorrem em cascata, podendo estar envolvidas uma reprogramação e expressão daquelas células morfogeneticamente competentes, o que justificaria a presença de células em estádios diferenciados. Essa falta de sincronia no processo organogênico *in vitro* em *Passiflora*, também foi relatada por Dornelas e Vieira (1994), Appezzato-da-Glória et al. (1999), Biasi et al. (2000) e Monteiro-Hara (2003). Uma outra hipótese para a eficácia do TDZ na indução de resposta morfogênica pode estar relacionada a sua grande estabilidade (Mok e Mok 1985; van Nieuwkerk et al. 1986; Lu 1993). Há que considerar-se também, que efeitos indiretos são atribuídos ao TDZ, tais como a acumulação de citocininas purínicas (Capelle et al. 1983; Thomas e Katterman 1986) e/ou a inibição da atividade da citocinina oxidase (Kaminek e Armstrong 1990). Com base no exposto, observa-se que as propriedades atribuídas ao TDZ podem provocar alterações estruturais na região do explante que está em contato com o meio de cultura contendo esta substância. E sugere-se, ademais, que estas alterações na indução da resposta morfogênica, não parecem relacionar-se decisivamente com a polaridade.

As respostas morfogênicas auferidas pelos explantes cultivados em meio contendo BAP e TDZ mostram, claramente, que a magnitude da polaridade estabelecida nos extremos dos explantes pode ser alterada pela natureza química da citocinina e pela orientação do explante nesses meios de cultura.

Ao se confrontar a descrição dos resultados com base na morfologia assumida pelo explante, com aquela dos resultados com base na histologia, constata-se alguns contrastes nas respostas morfogênicas em ambos extremos dos explantes. A magnitude desses contrastes é dependente da presença e da natureza química das citocininas e da orientação do explante no meio de cultura. Embora esses dois tipos de análise tenham sido realizados a tão somente 14 dias de incubação, este trabalho mostra, claramente, a importância maior das análises histológicas para se extrair, com maior precisão, as conclusões dos resultados de trabalhos morfogênicos *in vitro*. Na literatura revisada, não foi encontrado nenhum trabalho, cujos resultados permitissem confrontar os resultados deste trabalho.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aguiar DRD & Santos CCF (2001) Importância econômica e mercado. In: Bruckner CH & Picanço MC (eds) **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-Colheita, Agroindústria, Mercado**, (pp. 9-31). Cinco Continentes, Porto Alegre
- Appezato-da-Glória B, Vieira MLC & Dornelas MC (1999) Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesq. Agropec. Bras.**, 34: 2007-2013
- Biasi LA, Falco MC, Rodriguez APM & Mendes BMJ (2000) Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Sci. Agric.**, 57: 661-665.
- Bruckner CH (1994) **Auto-incompatibilidade no maracujá (*Passiflora edulis* Sims)**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Capelle SC, Mok DWS, Kirchner SC & Mok MC (1983) Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiol.**, 73: 796-802.
- Couceiro AM (2002) **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Davies PJ (1987) **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Dornelas MC & Vieira MLC (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 36: 211-217.
- Faria JLC & Segura J (1997) Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, 32: 1276-1277.
- García-Luis A, Bordón Y, Moreira-Dias JM, Molina RV & Guardiola JL (1999) Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Ann. Bot.**, 84: 715-723.
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw Hill Book Company, New York
- Kaminek M & Armstrong DJ (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. **Plant Physiol.**, 93: 1530-1538
- Kantharajah AS & Dodd WA (1990) *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit). **Ann. Bot.**, 65:337-369.

- Kawata K, Ushida C, Kawai F, Kanamori M & Kuriyama A (1995) Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **J Plant Physiol.**, 147: 281-284.
- Komissarov, D. A. **Biological Basis for the Propagation of Woody Plants by Cuttings**. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1969: 250p.
- Lima A de A, Caldas RC, Cunha MAP da & Santos Filho HP Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujazeiro amarelo. **Rev. Bras. Frutic.**, 21: 318-321, 1999.
- Lima MM de & Gonçalves NA (1998) Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Sci. Forest.**, 53: 49-56.
- Lorenzi H & Matos FJA (2002) Passifloraceae. In: _____ (eds) **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, (pp. 371-374). Instituto Plantarum, Nova Odessa
- Lu C-Y (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 29: 92-96.
- Mok MC & Mok DWS (1985) The metabolism of [^{14}C] - thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiol. Plant.**, 65: 427-432.
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y & Okamoto T (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-urea (thidiazuron). **Phytochemistry**, 21: 1509-1511.
- Mok MC, Mok DWS, Turner JE & Mujer CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, 22: 1194-1197.
- Monteiro-Hara CB de A (2003) **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***, Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Moran Robles MJ (1978) Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, 33: 693-699.
- Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordón Y, Guardiola JL & García-Luis A (2000) Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer

- citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Ann. Bot.**, 85: 103–110.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, 15: 473-497.
- Murthy BNS, Murch SJ & Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 34: 267–275.
- Nick P & Faruya M (1992) Induction and fixation of polarity: early steps in plant morphogenesis. **Dev. Growth Diff.**, 34: 115-125.
- Paolicchi F, Mensuali-Sodi A & Tognonia F (2002) Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L. **Sci. Horti.**, 92: 305-315.
- Roeser KR (1972) Die nadel der schwarzkiefer-massen produkt und kunstwert der natur. **Mikrokosmos**, 61: 33-36.
- Ruggiero C (1991) Enxertia do maracujazeiro. In: São José AR, Ferreira FR & Vaz RLA (coords) **Cultura do maracujá no Brasil**, (pp. 43-60). FUNEP, Jaboticabal
- Skoog F & Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symp. Soc. Exp. Bot.**, 11: 118-140.
- Thomas JC & Katterman FR (1986) Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiol.**, 81: 681-683.
- van Nieuwkerk JP, Zimmerman RH & Fordham I (1986) Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, 21: 516-518.
- Wareing PF & Phillips IDJ (1975) **The control of growth & differentiation in plants**. Pergamon Press, Oxford.
- White PR (1951) Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 2: 231-244.
- Zhang C-L, Chen D-F, Elliott MC & Slater A (2001) Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 37: 305-310.

CAPÍTULO 3

O potencial do TDZ na indução da morfogênese em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial do TDZ na indução da morfogênese em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro. Os segmentos foram extraídos, assepticamente, do hipocótilo de plântulas crescidas e desenvolvidas *in vitro*, e cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de diferentes concentrações (doses) isoladas de TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina). Os cinco explantes hipocotiledonares de cada plântula, numerados de 1 a 5, e, nesta ordem, foram cultivados nos referidos meios, na posição horizontal, em placas de Petri. Após a inoculação dos explantes, as placas foram fechadas e transferidas para sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, por 35 dias, sendo 20 dias em condições de escuro absoluto e 15 dias na condição de 16/8 horas de luz/escuro e irradiância de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A resposta morfogênica foi avaliada com base nas análises morfológica e histológica, aos 35 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 6 doses x 5 segmentos x 2 extremos, com 5 repetições. Não houve gradiente de resposta morfogênica entre os segmentos, tomados nas cinco diferentes posições ao longo do eixo hipocotiledonar; o TDZ, em relação ao BAP, apresentou maior potencial para induzir e expressar respostas morfogênicas em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro; segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro podem ser induzidos à formação de estruturas organogênicas e semelhantes a proembriões sob influência do TDZ, sendo estas rotas morfogênicas dependentes da concentração deste fitorregulador; o TDZ oferece, assim, novas possibilidades para investigação de sinais específicos na regulação de processos morfogênicos; a análise da resposta morfogênica, com base na histologia, permite confirmar os resultados de morfologia externa com precisão e detalhamento.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é planta altamente valorizada, devido a seus atributos alimentícios (Aguiar e Santos 2001) e farmacológicos (Lorenzi e Matos 2002). O Brasil ocupa posição de destaque como um importante produtor mundial de maracujá amarelo, por apresentar condições edafoclimáticas adequadas ao seu cultivo. Apesar de suas destacadas qualidades econômicas, o maracujazeiro é uma planta alógama, obstáculo este, agravado pela auto-incompatibilidade (Bruckner et al. 1995), acarretando, assim, alta taxa de segregação gênica. Esta, por sua vez, redundando em uma população de plantas genotipicamente heterogênea, fato que, segundo Ruggiero (1991), Bruckner (1994) e Lima et al. (1999), acentua, ainda mais, o problema da auto-incompatibilidade, além da desuniformidade cultural.

Para a produção de mudas de maracujazeiro, se emprega, comumente, a via seminífera (Manica 1981; Ruggiero 1987), razão pela qual é praticamente impossível obter plantas, tampouco populações homogêneas de plantas. Esta homogeneidade é uma das premissas mais importantes da propagação clonal (Kantharajah e Dodd 1990; Monteiro et al. 2000). Nesse sentido, a cultura de células e tecidos vegetais poderá constituir-se em um método eficiente na produção de mudas com alto padrão de qualidade genética e fitossanitária. Essa técnica vem sendo utilizada com êxito para a obtenção de mudas em numerosas espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação por outros métodos (Paiva 1998) ou bem por impedimentos de ordem técnica interpostos por normativas governamentais. Por outra parte, a utilização desta técnica constitui-se numa importante ferramenta para trabalhos de melhoramento genético, por apresentar amplas e variadas possibilidades de uso. Ademais, a cultura de células e tecidos vegetais apresenta grande potencial para estudos de fenômenos citológicos, morfológicos e fisiológicos.

Nos últimos anos, os grandes avanços dos cultivos *in vitro* têm permitido a realização de trabalhos de cultura de células e tecidos vegetais em distintas espécies do gênero *Passiflora*. Por exemplo, êxito se tem logrado na obtenção de brotos *in vitro* em diferentes espécies, híbridos intergenéricos e intraespecíficos desse gênero (Nakayama 1966; Moran Robles 1978, 1979; Scorza e Janick 1980; Kantharajah e Dodd 1990; d'Utra Vaz et al. 1993; Otoni et al. 1995; Alexandre 2002; Couceiro 2002).

No processo de organogênese da parte aérea, em espécies de *Passiflora*, tem-se utilizado diferentes tipos de explantes, tais como cotilédones, discos foliares, segmentos nodais e internodais, cultivados em meios de cultura contendo, normalmente, apenas citocininas como regulador de crescimento (Moran Robles 1979; Baccarin 1988; Drew 1991; Faria e Segura 1997; Couceiro 2002). Dados registrados por estes autores mostram que a adição de citocininas ao meio de cultura é fundamental para induzir a resposta morfogênica *in vitro*. As citocininas do grupo das adeninas, têm sido correntemente utilizadas, especialmente a cinetina, zeatina e BAP (6-Benzilaminopurina), sendo esta última a mais empregada, por promover, em geral, melhor resposta na formação de estruturas.

Um segundo grupo de compostos, com atividade citocinínica, pertence à classe das tidiazolurétrias, no qual está incluído o TDZ (Mok et al. 1982). O TDZ tem se mostrado tão efetivo, quanto o BAP, na indução da organogênese (Mok et al. 1982; Fiola et al. 1990; Malik e Saxena 1992; Mohamed et al., 1992) ou da embriogênese (Gill e Saxena, 1992) em várias espécies vegetais. Neste caso, o TDZ tem sido adicionado ao meio de cultura, geralmente combinado com outros fitorreguladores, tais como 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), ANA (ácido α -naftalenoacético), ou BAP (van Nieuwkerk 1986; Kerns e Meyer 1987; Chalupa 1988; Mohamed et al. 1992; Mithila et al. 2003).

Nos trabalhos revisados, apenas o de Monteiro-Hara (2003) avaliou o potencial indutor do TDZ na morfogênese de *Passiflora*, constatando-se a formação de estruturas globulares e de gemas adventícias em discos foliares, quando cultivados em meios contendo BAP e TDZ, separadamente. Este autor, ao analisar os cortes histológicos dos explantes, verificou que as estruturas globulares eram embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento. Este trabalho ressalta a importância dos estudos histológicos na identificação da rota morfogênica. Caracterizada a rota, pode-se estabelecer condições mais adequadas de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e obtenção de plantas.

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial do TDZ, como indutor da morfogênese em explantes de maracujazeiro, tomados em cinco distintas posições do hipocótilo, e comparar o efeito indutor do TDZ com o do BAP.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Foram utilizados, como explantes, segmentos hipocotiledonares, obtidos de plântulas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), germinadas e crescidas *in vitro*. As sementes foram extraídas de frutos maduros, obtidos de uma única planta pertencente ao pomar da Universidade Federal de Viçosa. Após completa remoção do tegumento, mediante uso de uma mini-morsa (Couceiro 2002), as sementes foram desinfestadas com ácido hipocloroso a 0,5 % (v/v) por cinco minutos, seguidos de quatro enxaguaduras com água desionizada estéril, em tempos de 5, 10, 10 e 10 minutos, respectivamente. Posteriormente, uma semente foi inoculada por tubo de ensaio (25 x 135 mm), contendo aproximadamente 10 mL de meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige e Skoog 1962), adicionado de sacarose (3 %, p/v). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 0,8 % (p/v) de ágar (ISO FAR[®]). Tais tubos com as sementes foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em grades metálicas e mantidos em câmara de cultivo à temperatura de 27 ± 2 °C, em escuro, por 20 dias.

De cada plântula estiolada, vigorosa, com hipocótilo retilíneo e comprimento mínimo de 7 cm, foram obtidos cinco segmentos hipocotiledonares (10 a 12 mm de comprimento). Para se especificar a posição do segmento (explante) no hipocótilo, se seguiu a numeração desde 1 até 5, sendo 1, o mais próximo ao nó cotiledonar e o 5, o mais distante deste.

2. Condições de cultivo

Para o cultivo dos explantes hipocotiledonares, utilizou-se o meio contendo os minerais nutrientes de MS, com adição de sacarose (3 %, p/v), vitaminas de White (1951), e das citocininas: TDZ (Tidiazuron, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) e BAP (6-Benzilaminopurina, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), respectivamente nas doses de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ e de 0,0 e 0,7 mg L⁻¹, sem combinação das mesmas, totalizando 6 tratamentos. Estas doses foram tomadas com base em trabalhos anteriores (dados não publicados). Os meios de cultivo tiveram o pH

ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 0,7 % (p/v) de ágar (ISO FAR®). A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121 °C, por 20 minutos. Em seguida, foram vertidos aproximadamente 25 mL dos meios de cultura em placa de Petri (65 x 14 mm). Os cinco explantes hipocotiledonares de cada plântula, numerados de 1 a 5, e, nesta ordem, foram cultivados na posição horizontal, distribuídos, equidistantemente, na metade da superfície do meio de cada placa de Petri, com esta comportando 10 explantes, equivalendo aos eixos hipocotiledonares de duas plântulas. Cada tratamento constou de 10 repetições (cinco placas de Petri). Após a inoculação dos explantes, as placas foram fechadas e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®), e dispostas em estantes da sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, por 35 dias, sendo 20 dias em condições de escuro absoluto e 15 dias na condição de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes (OSRAM® 40 W, branca, luz do dia).

3. Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada através de observações visuais, ao final dos vinte dias da fase de escuro absoluto e ao final dos 15 dias, após transferência dos explantes para o fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro). Avaliou-se os 50 explantes hipocotiledonares de cada um dos 6 tratamentos, mediante o auxílio de lupa binocular (ZEISS®). Foram avaliadas as seguintes características: coloração, formação e tamanho dos calos (mm^2). Considerou-se calo a estrutura, cuja proliferação celular no extremo dos segmentos hipocotiledonares media mais de 2 mm de largura por 1 mm ou mais de altura. Proliferações com valores iguais ou inferiores a estes, foram denominadas de intumescimento do extremo. A medição do tamanho do intumescimento ou calo foi realizada através de papel milimetrado.

4. Análise histológica

Para os estudos de histologia, foram analisados os segmentos hipocotiledonares (explantes) tomados da posição 1, da posição 3 e da posição 5, a partir do nó hipocotiledonar. A seleção apenas dos explantes nestas três posições, se baseou nos resultados da análise morfológica e da análise histológica de ensaio anterior, em que foram analisados os 5 explantes hipocotiledonares, cultivados sob influência dos mesmos tratamentos citocinínicos, explantes com a mesma distância

do nó hipocotiledonar e orientação no meio de cultivo. Estas análises acusaram alterações morfogênicas semelhantes em cada um dos extremos, para os 5 explantes. Assim, foram selecionados os explantes de número 1, 3 e 5, em razão de ocuparem posições equidistantes no eixo hipocotiledonar.

Deste modo, após o período de 35 dias de incubação, de cada um dos 6 tratamentos, tomou-se os 10 explantes da posição 1, os 10 explantes da posição 3 e os 10 explantes da posição 5 do eixo hipocotiledonar. Dos explantes de cada posição, foram coletadas, separadamente, as estruturas calogênicas, formadas nos seus dois extremos (proximal e distal) para a realização das análises histológicas. Após a coleta, foram imediatamente fixadas em FAA₅₀ (formaldeído: ácido acético glacial: etanol 50 %; 5: 5: 90, v: v: v), por um período de 24 horas. Passado esse tempo, foram estocadas em etanol 70 % (v/v), até o momento de sua utilização. Posteriormente, foram desidratadas em série butílica terciária e incluídas em parafina + cera (Johansen 1940). Secções longitudinais (11 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo SPENCER-820[®], e colocadas em lâminas histológicas. Após desparafinização e hidratação em série xilólica / etílica, os cortes seriados foram corados com fucsina básica a 1 % [etanol 50 % (v/v) (Roeser 1972)] e azul de astra a 0,5 % [em ácido tartárico a 2 % (Roeser 1972)]. Assim tratados, os cortes foram montados entre lâminas e lamínulas, com bálsamo do Canadá. As imagens digitalizadas para análises foram obtidas em um microscópio de luz (OLYMPUS AX-70[®]), utilizando-se o programa IMAGE PRO-PLUS[®].

5. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6 x 3 (doses x segmentos), com 5 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri contendo 10 segmentos, extraídos do eixo hipocotiledonar de duas plântulas, a partir do nó.

RESULTADOS

1. Análise morfológica

Observações visuais dos explantes aos 20 dias iniciais de cultivo (fase de escuro absoluto), mostraram a presença de estruturas calogênicas, de coloração branco-translúcida (tratamentos controle e BAP) e branco-cremosa (tratamentos com TDZ), independentemente da distância do explante ao nó cotiledonar.

Observações aos 15 dias após transferência dos explantes da fase de escuro absoluto para a condição de fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), mostraram que, para os explantes cultivados no meio com ausência das duas citocininas (controle) ou com adição de BAP, a formação dos calos se restringiu às extremidades proximal e distal dos explantes, com estes calos assumindo coloração branco-amarelada. É interessante salientar que no extremo proximal formou-se, na sua face cortada, uma fina camada cicatricial, constituída de células pequenas, coloração branco gelo e com emergência de protuberâncias disformes. Quando os explantes foram cultivados em meio contendo TDZ, houve formação de calos ao longo de todo o explante, os quais apresentavam coloração branco-esverdeada.

Com relação ao tamanho dos calos formados, observou-se diferenças marcantes, em valores absolutos, dependendo da presença ou não de citocinina ou de sua natureza química. Nos explantes cultivados no tratamento com BAP, verificou-se que os calos formados nos extremos proximal ($41,25 \text{ mm}^2$) e distal ($40,10 \text{ mm}^2$) atingiram maior tamanho, quando comparado com os calos formados nos extremos proximal ($11,26 \text{ mm}^2$) e distal ($10,0 \text{ mm}^2$) dos explantes inoculados no tratamento controle. Ao se analisar os explantes cultivados nos tratamentos contendo TDZ, observou-se diferenças, em valores absolutos, entre as concentrações testadas de 1, 2, 3 e 4 mg L^{-1} desta citocinina, nas quais os calos atingiram os tamanhos de $53,49 \text{ mm}^2$, $42,32 \text{ mm}^2$, $41,98 \text{ mm}^2$ e $41,73 \text{ mm}^2$, respectivamente. Estes tamanhos dos calos sugerem uma relação inversa entre a concentração de TDZ e esta variável.

2. Influência da posição do explante no eixo hipocotiledonar sobre a resposta morfogênica

Aos 15 dias após transferência dos explantes da fase de escuro absoluto para a condição de fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), a avaliação da influência da distância

do explante, a partir do nó cotiledonar, permitiu constatar não haver gradiente de resposta morfogênica entre os cinco segmentos hipocotiledonares (explantes). Os calos apresentaram características morfológicas semelhantes, independentemente da presença ou não das citocininas testadas no meio de cultivo. Porém, constatou-se variação em tamanho, de modo especial, quando comparado ao tratamento controle.

3. Análise histológica

Nos explantes cultivados no meio com ausência de citocininas (controle), as alterações anatômicas podem ser visualizadas nas Figuras 1A e 1B. Em ambos extremos, observa-se uma região alterada, na qual é detectada intensa atividade mitótica, resultando no espessamento do procâmbio. Espessamento este, decorrente de divisões periclinais em regiões mais internas dos respectivos extremos, de divisões anticlinais e periclinais na base dos mesmos e da presença do procâmbio e região meristemática. No extremo distal, verifica-se uma menor atividade mitótica, resultando em menor proliferação celular (menor espessamento), se comparada com o extremo proximal.

Nos explantes cultivados em meios contendo BAP, observou-se em ambos extremos (Figuras 1C e 1D), que as alterações estruturais seguiram padrão semelhante às alterações visualizadas no tratamento controle (Figuras 1A e 1B). Assim, ao comparar os extremos proximal e distal, verifica-se de novo, que o proximal apresentou maior atividade mitótica, resultando em uma região mais desenvolvida. Em ambos os extremos, não foram observadas estruturas organogênicas ou embriogênicas (Figuras 1C e 1D).

Nos tratamentos com TDZ, a dose de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figuras 2A e 2B) proporcionou intensa atividade mitótica nos explantes, resultando em células pequenas, esféricas, de citoplasma denso, núcleo visível, as quais formaram regiões meristemáticas que, posteriormente, evoluíram para meristemóides (Figura 3A), sendo possível verificar pequenas protusões, com início da diferenciação dos primórdios foliares na superfície do calo (Figura 3B).

Ademais, a expressão morfogênica progrediu na periferia dos explantes, para estruturas organogênicas (Figura 3B). Na periferia do calo, pode-se observar a formação de nódulos vasculares, estabelecendo a conexão vascular do calo com as estruturas organogênicas (Figuras 3A e 3B). Constatam-se, também, grupos de

células pequenas e densas, formando regiões de massa celular compacta, isodiamétrica, com aspecto de centros meristemáticos (estruturas semelhantes a proembriões), tipicamente celularizados (Figuras 3C e 3D). Estas estruturas semelhantes a proembriões são constituídas por células pequenas, núcleos proeminentes e paredes finas, com aspecto de uma esfera compacta, com divisões aparentes em vários planos. Portanto, estruturas provenientes de células internas do tecido que formava o calo, e, não havendo evidência de conexão vascular dessa estrutura com o tecido do explante (Figuras 3C e 3D). Nas concentrações de 2,0 a 4,0 mg L⁻¹ de TDZ, observa-se maior atividade mitótica, originando células de conformação regular e regiões meristemáticas, sendo melhores visualizadas na concentração de 4,0 mg L⁻¹ (Figuras 2C e 2D). Com relação à formação de estruturas, o proembrião se formou, de maneira mais clara, na presença de 1,0 mg L⁻¹ de TDZ; e estruturas organogênicas não foram visualizadas nas concentrações, a partir de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ.

Os cortes histológicos seriados mostraram que todos os explantes hipocotiledonares apresentaram respostas morfogênicas semelhantes nos respectivos extremos (proximal e distal), independentemente da presença ou não de citocininas no meio de cultura e da posição dos explantes no eixo hipocotiledonar. Portanto, não se estabeleceu um gradiente na resposta morfogênica, conforme se distanciou do nó cotiledonar.

Figura 1A, B, C e D - Corte histológico longitudinal, extremos proximal (**EP**) e distal (**ED**), de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*, cultivados em meio de cultura, e incubados por 35 dias em sala de crescimento. Barra: 100 μ m. **A e B**. Tratamento controle: observa-se formação do calo, derivado das atividades do procâmbio (pc) e região meristemática (rm); **C e D**. Tratamento com BAP: observa-se que a formação do calo seguiu padrão semelhante àquele das alterações estruturais visualizadas no tratamento controle.

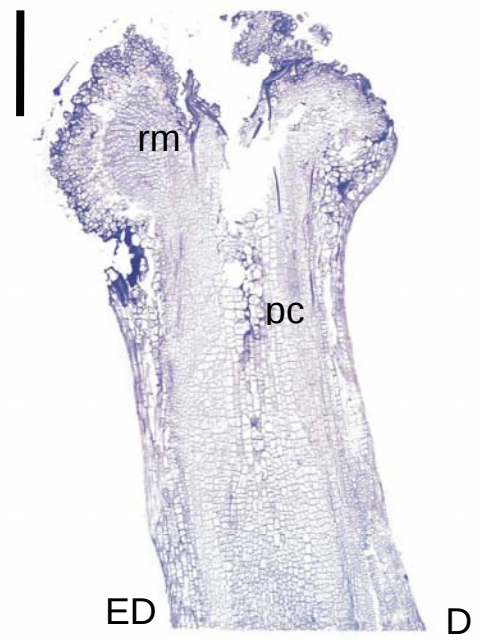
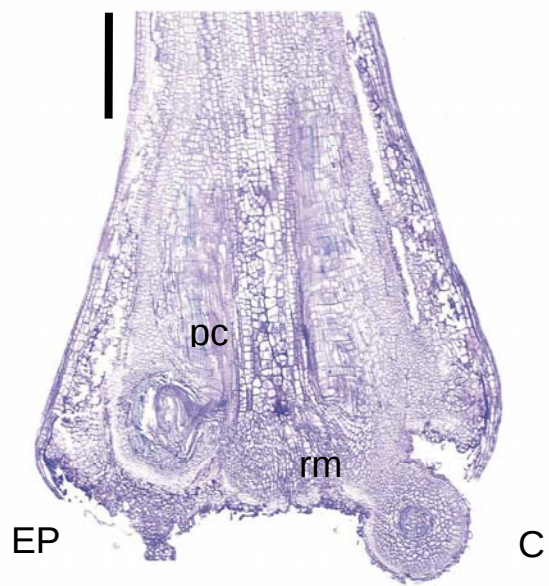
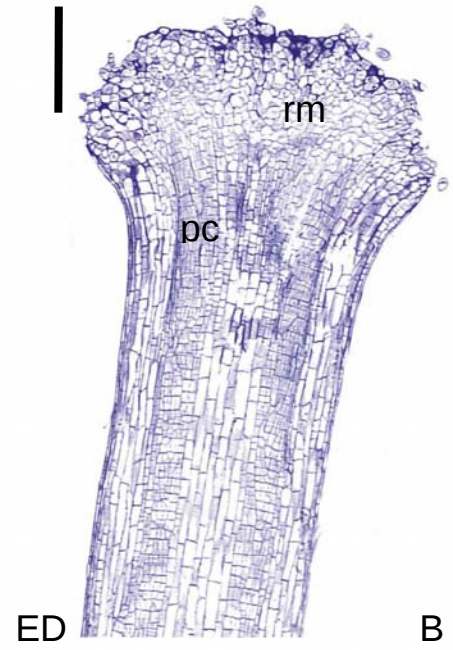
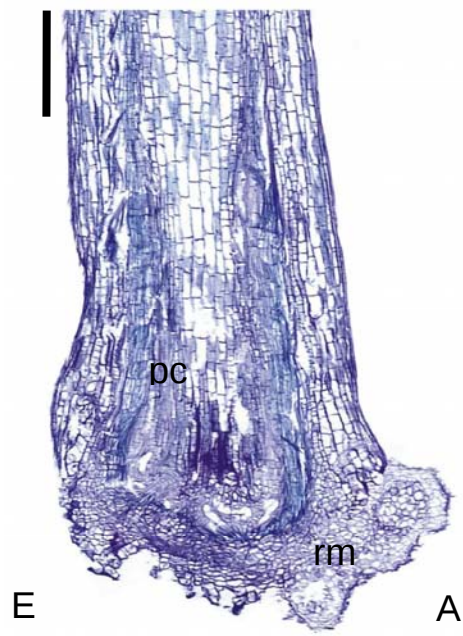


Figura 2A, B, C e D - Corte histológico longitudinal, extremos proximal (**EP**) e distal (**ED**), de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura contendo TDZ, e incubados por 35 dias em sala de crescimento. Barra: 100 μ m. **A e B**. Tratamento com 1,0 mg L⁻¹: visualiza-se intensa atividade mitótica na superfície do calo (seta), resultando em células de conformação regular, formando regiões meristemáticas (rm), sendo possível verificar pequenas protusões (pr) e estruturas organogênicas (eg) na periferia do calo; **C e D**. Tratamento com 4,0 mg L⁻¹: observa-se atividade mitótica intensa na superfície do calo (seta), resultando em células de conformação regular e regiões meristemáticas (rm).

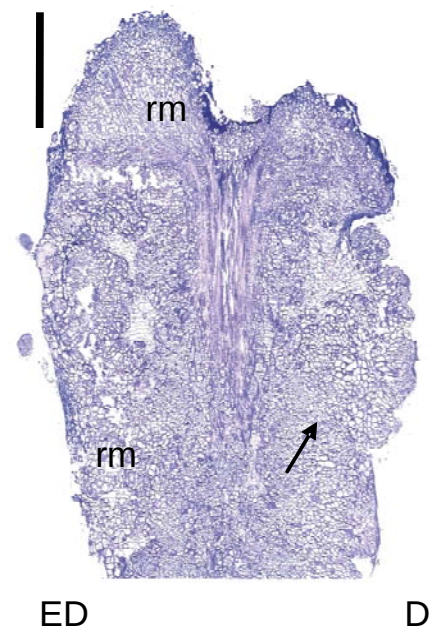
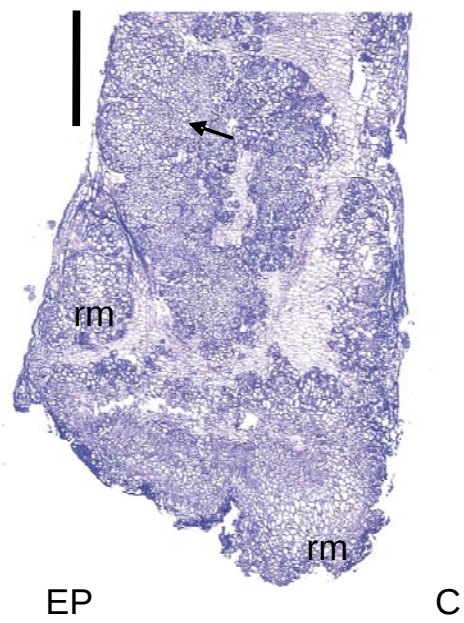
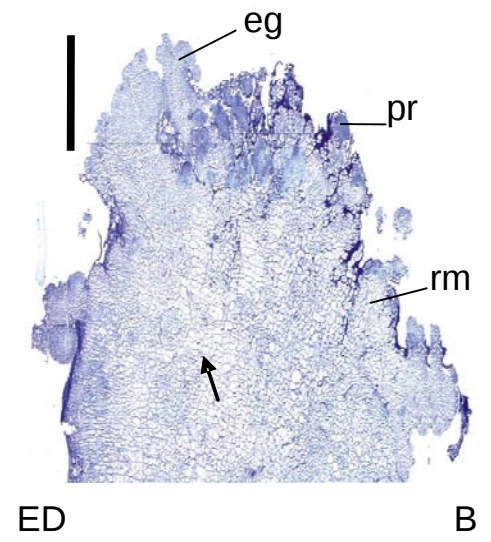
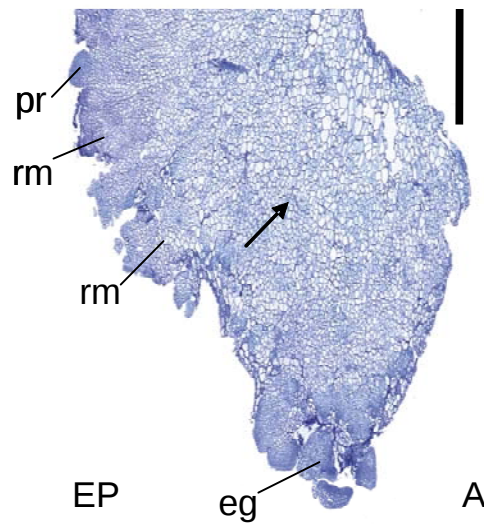
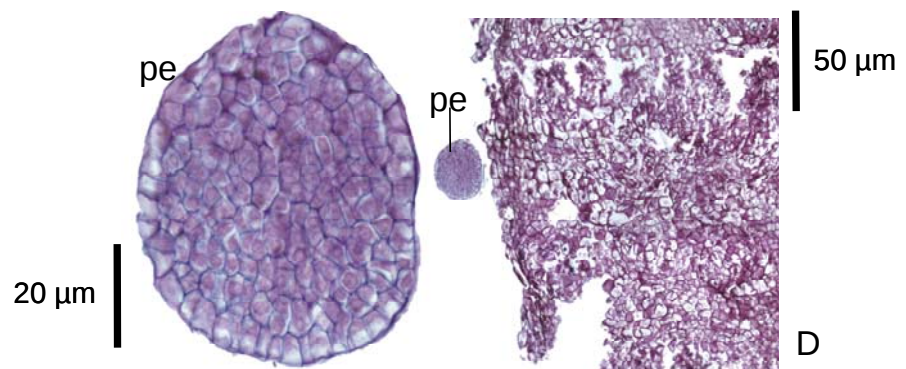
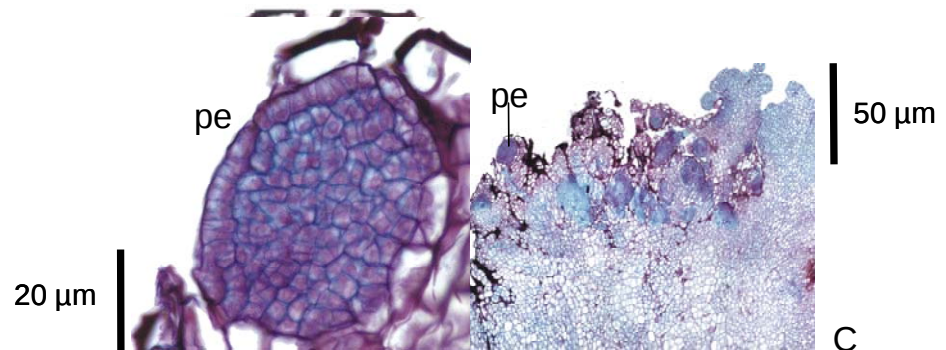
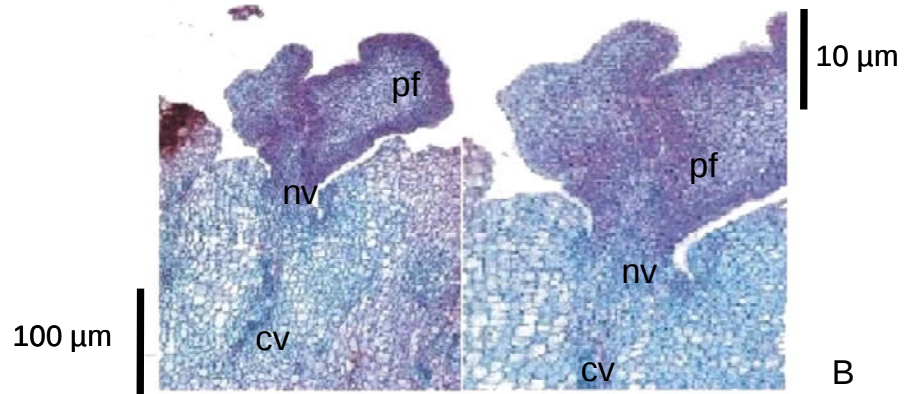
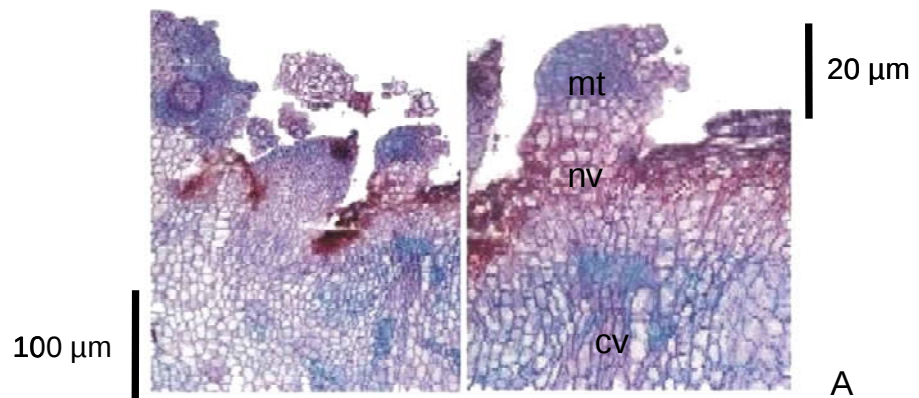


Figura 3A, B, C e D - Corte histológico longitudinal de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* cultivados em meio de cultura contendo 1,0 e 4,0 mg L⁻¹ de TDZ, e incubados por 35 dias em sala de crescimento. **A e B.** Estrutura morfogênica formada a partir da proliferação celular na periferia do calo, evidenciando-se conexão vascular (cv), nódulo vascular (nv), meristemóide (mt) (**A**) e primórdios foliares (pf) (**B**); **C e D.** proembriões (pe), estrutura tipicamente celularizada, com núcleo proeminente, intensa atividade mitótica e membrana delimitante bem definida; **C.** Proembrião formando-se diretamente do explante; **D.** Proembrião aparentemente desconectado do explante.



DISCUSSÃO

As observações visuais e os cortes histológicos seriados dos explantes cultivados em meio de cultura contendo as citocininas BAP e TDZ ou com ausência de ambas, mostraram respostas diferenciadas dos explantes, no referente à indução de resposta morfogênica (Figuras 1, 2 e 3). Resultados semelhantes aos observados por Monteiro-Hara (2003), ao trabalhar com discos foliares de plantas da mesma espécie em estudo, e também cultivados em meio contendo BAP e TDZ.

Com relação à capacidade do BAP em induzir respostas morfogênicas em maracujazeiro, resultados similares foram relatados para *Passiflora*, com diferentes tipos de explantes (Appezzato-da-Glória et al. 1999; Biasi et al. 2000; Couceiro 2002).

Ao se analisar o potencial do TDZ em induzir respostas morfogênicas em explantes de maracujazeiro, verificou-se que este se mostra mais efetivo, morfogenicamente, que o BAP. Pois, além de induzir a formação de estruturas calogênicas de maior tamanho, induziu, também, a formação de estruturas organogênicas em vários estádios de desenvolvimento (Figuras 2, 3A e 3B) e estruturas semelhantes a proembriões (Figuras 3C e 3D). Estas estruturas não foram detectadas no tratamento com BAP. Com relação à capacidade indutora do TDZ, esta está de acordo com os resultados obtidos por Monteiro-Hara (2003), também em maracujazeiro. A visualização de regiões meristemáticas dando origem a meristemóides, bem como a presença de nódulos e conexões vasculares das estruturas organogênicas com o calo (Figuras 3A e 3B), já haviam sido relatadas por Monteiro-Hara (2003). Essas estruturas indicam o início da diferenciação das gemas, fato, também, já constatado por Appezzato-da-Glória et al. (1999), também trabalhando com maracujazeiro. A presença de estruturas, em vários estádios de desenvolvimento, em um mesmo explante de maracujazeiro, é um indicador de que esta cultura apresenta um processo assincrônico da organogênese *in vitro*. Isto pode ser devido aos eventos em cascatas que seguem, quando dos tratamentos com TDZ, que segundo Carman (1990) e Murthy et al. (1996) pode envolver reprogramação e expressão de células morfogeneticamente competentes, permitindo assim, células em estádios diferenciados. Essa falta de sincronia no processo organogênico *in vitro* em

Passiflora, também foi relatada por Dornelas e Vieira (1994), Appezzato-da-Glória et al. (1999) e Biasi et al. (2000).

Neste estudo, o aspecto de relevância foi a confirmação do potencial do TDZ em induzir respostas morfogênicas, tanto pela via organogênica, quanto pela embriogênica, no corpo de um único explante de origem hipocotiledonar (Figuras 2A, 2B e 3). Resultados semelhantes foram relatados por Monteiro-Hara (2003), trabalhando com discos foliares de maracujazeiro, e Mithila et al. (2003), trabalhando com discos foliares e pecíolos de *Saintpaulia*, cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de TDZ, onde ambos autores obtiveram, também, no mesmo explante, respostas morfogênicas (organogênese e embriogênese) diferenciadas. Não obstante, o presente trabalho reveste-se da maior importância, pelo fato de segmentos extraídos do eixo hipocotiledonar constituírem explantes modelos para propagação *in vitro* do maracujazeiro. Com base na literatura revisada, este é o primeiro trabalho a avaliar o potencial morfogênico desse tecido em meios de cultura contendo o TDZ.

Inicialmente, o TDZ foi utilizado como desfolhante de algodoeiro e, nas últimas décadas, foi incorporado aos cultivos *in vitro* como indutor morfogênico, atuando como um substituto de auxina e citocinina, na organogênese e embriogênese em várias espécies (Murthy et al. 1998). A explicação para a capacidade do TDZ em induzir resposta embriogênica, geralmente mediada por auxinas, está relacionada com o mecanismo de atuação do TDZ. Segundo Gill e Saxena (1992), a formação de estruturas embriogênicas, na presença de TDZ, em explantes de discos foliares e cotilédones de sementes germinadas *in vitro* de *Arachis hypogaea*, indica que este fitorregulador pode atuar na biossíntese, não apenas das citocininas, mas também de outros reguladores de crescimento endógenos, sugerindo, inclusive, que a auxina necessária à indução embriogênica pode ser sintetizada pela mediação do TDZ. Os autores seguem relatando que o modelo pode ser similar ao descrito para a biossíntese de citocininas induzidas pelo TDZ, ou inibir a degradação de auxinas endógenas. Estas conclusões são corroboradas por Murthy et al. (1995), ao trabalharem com *Arachis*, e por Mithilla et al. (2003), ao trabalharem com *Saintpaulia*, e analisarem os níveis hormonais endógenos em explantes *in vitro*. Portanto, resultados obtidos, neste estudo, sobre a indução de estruturas organogênicas e embriogênicas em explantes de maracujazeiro, cultivados em meios

contendo TDZ, realçam as evidências para o papel desta tiazoluréia na modulação do metabolismo de auxina no processo morfogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar DRD, Santos CCF (2001) Importância econômica e mercado. In: Bruckner CH, Picanço MC (eds) **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-Colheita, Agroindústria, Mercado**. Cinco Continentes, Porto Alegre, pp 9-31
- Alexandre, RS (2002) **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- Appezato-da-Glória B, Vieira MLC, Dornelas MC (1999) Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesq Agropec Bras**, 34:2007-2013
- Baccarin, MNRA (1988) **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* sp.** Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba
- Biasi LA, Falco MC, Rodriguez APM, Mendes BMJ (2000) Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Sci Agric**, 57:661-665
- Bruckner CH (1994) **Auto-incompatibilidade no maracujá (*Passiflora edulis* Sims)**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- Bruckner CH, Casali VWD, Morales CF de, Regazzi AJ, Silva, EAM da 1995 Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Hort**, 370:45-57
- Carman JG (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. **In Vitro Cell Dev Biol**, 26:746-753
- Chalupa V (1988) Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. **Biol Plant**, 30:414-21
- Couceiro AM (2002) **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- D’Utra Vaz FB, Santos AVP dos, Manders G, Cocking EC, Davey MR, Power JB (1993) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener.): the importance

- of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Rep**, 12: 220-225
- Dornelas MC, Vieira MLC (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell Tiss Org Cult**, 36:211-217
- Drew RA (1991) *In vitro* culture of adult and juvenile buds of *Passiflora* species. **Plant Cell Tiss Org Cult**, 26:3-27
- Faria JLC, Segura J (1997) Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, 32:1276-1277
- Fiola JA, Hassan MA, Swartz HJ, Bors RH, Mcnicols R (1990) Effects of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell Tiss Org Cult**, 20:223-228
- Gill R, Saxena PK (1992) Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. **Can J Bot**, 70:1186-1192
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw Hill Book Company, New York
- Kantharajah AS, Dodd WA (1990) *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit). **Ann Bot**, 65:337-369
- Kerns HR, Meyer JR MM (1987) Diligence finds chemical key to micropropagating a new maple. **Amer Nurseryman**, 165:104-10
- Lima A de A, Caldas RC, Cunha MAP da, Santos Filho, HP (1999) Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujazeiro amarelo. **Rev Bras Frutic**, 21:318-321
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Passifloraceae. In:_____ (eds) **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa pp. 371-374
- Malik KA, Saxena PK (1992). Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). **Aust J Plant Physiol**, 19:731-40
- Manica I (1981) Fruticultura tropical: maracujá. Agronômica Ceres, São Paulo
- Mithila J, Hall JC, Victor, JMR, Saxena PK (2003) Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentration and somatic embryogenesis at high

- concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Plant Cell Rep**, 21:408-414
- Mohamed MF, Read PE, Coyne DP (1992) Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *J Am Soc Hort Sci* 117: 668
- Mok MC & Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y, Okamoto T (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, 21:1509-1511
- Monteiro ACB. de A, Nakazawa GT, Mendes BMJ, Rodriguez APM (2000) Regeneração *in vitro* de *passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Sci Agric**, 57:571-573
- Monteiro-Hara, CB de A (2003) **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Pasiflora***, Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba
- Moran Robles MJ (1978) Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, 33: 693-699
- Moran Robles MJ (1979) Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *Passiflora mollissima* Bailey en culture “*in vitro*”. **Turrialba**, 29:224-228
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant**, 15:473-497
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 34:267–275
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena, PK (1995) Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiol Plant**, 94:268-276, 1995
- Murthy BNS, Victor JMR, Singh RP, Fletcher RA, Saxena PK (1996) *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L): stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. **Plant Growth Regul**, 19:233-240

- Nakayama F. Cultivo *in vitro* de tecidos de *Passiflora caerulea*. **Rev Facultad Agronomía** 42:63-76, 1966
- Otoni WC, Casali VWD, Cecon PR, Davey MR, Power JB (1995) Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Rev Ceres**, 42:461-468
- Paiva, PD de O (1998) **Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras
- Roeser KR (1972) Die nadel der schwarzkiefer-massen produkt und kunstwert der natur. **Mikrokosmos**, 61:33-36
- Ruggiero C (1987) Implantação da cultura e propagação. In: _____ (ed) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, pp. 40-57
- Ruggiero C (1991) Enxertia do maracujazeiro. In: São José, AR, Ferreira, FR, Vaz, RLA (coords). Cultura do maracujá no Brasil. FUNEP, Jaboticabal, pp 43-60
- Scorza R, Janick J (1980) *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **J Am Soc Hort Sci**, 105: 892-897
- Van Nieuwkerk JP, Zimmerman RH, Fordham I (1986) Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, 21: 516-518
- White PR (1951) Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annu Rev Plant Physiol**, 2: 231-244.

CONCLUSÕES GERAIS

- Não houve gradiente de resposta morfogênica entre os segmentos tomados ao longo do eixo hipocotiledonar;
- A resposta morfogênica em segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro é dependente da presença e da natureza química das citocininas adicionadas ao meio de cultura em interação com o modo pelo qual o explante é inserido (orientado) no meio de cultura;
- O processo de morfogênese nos segmentos hipocotiledonares tem lugar, tanto por um processo de organogênese direta, como por um processo de organogênese indireta. A determinação do mecanismo de morfogênese depende da polaridade, assim como da relação entre a natureza química das citocininas adicionadas ao meio de cultivo e orientação dos segmentos hipocotiledonares nesses meios;
- Na organogênese direta, a diferenciação de gemas não necessita do aporte de citocinina, embora o número médio de gemas é aumentado, marcadamente, quando se adiciona BAP (e não TDZ) no meio de cultura; a organogênese indireta, por sua vez, depende criticamente da adição, tanto de BAP, como de TDZ ao meio de cultivo. Em presença de TDZ, a organogênese é sempre indireta;
- Quando o extremo distal dos segmentos não está em contato com o meio de cultivo (explantes na orientação vertical normal), gemas se formam na periferia do explante por um processo de organogênese direta. Em contato com o meio de cultivo (explantes na orientação horizontal ou na orientação vertical invertida), se forma um calo, o qual só é organogênico na orientação horizontal e, nesse caso, formando nódulos meristemáticos que originam gemas (organogênese indireta);
- O extremo proximal dos explantes, em contato com o meio de cultivo (explantes na orientação horizontal ou na orientação vertical normal), forma gemas por um processo de organogênese indireta, após a formação de um calo organogênico. Quando não está em contato com o meio de cultivo (explantes na orientação vertical invertida) forma um pequeno calo cicatricial, supostamente não organogênico;

- O maior número de gemas é obtido pelo extremo distal dos segmentos hipocotiledonares, cultivados em meio contendo BAP, na orientação vertical normal;
- A polaridade fisiológica que se estabelece nos extremos dos segmentos hipocotiledonares, bem como a magnitude desta polaridade, pode ser alterada pela natureza química da citocinina aplicada ao meio de cultivo, e pela orientação do explante nesses meios. Esta polaridade é marcadamente mais forte, quando se cultiva os segmentos hipocotiledonares na orientação vertical normal, em meios com presença de BAP. Na presença do TDZ, a polaridade não se estabeleceu;
- Segmentos hipocotiledonares podem ser induzidos à formação de uma massa de células semelhantes à proembriões e estruturas organogênicas sob influência do TDZ, sendo estas rotas morfogênicas dependentes da concentração deste fitorregulador;
- Os resultados adicionam subsídios para o entendimento da polaridade fisiológica que se estabelece nos extremos de segmentos hipocotiledonares, bem como do potencial indutor do TDZ na morfogênese do maracujazeiro;
- O TDZ oferece novas possibilidades para investigação de sinais específicos na regulação de processos morfogênicos.