

**LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS**

**Influência do etileno e de poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* do maracujá (*Passiflora* sp.)**

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

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2006**

**LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS**

**Influência do etileno e de poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* do maracujá (*Passiflora* sp.)**

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

**APROVADA: 21 de fevereiro de 2006.**

---

Prof<sup>a</sup>. Eny Iochevet Segal Floh  
(Conselheira)

---

Prof. Raimundo Santos Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Edgard A. de Toledo Picoli

---

Prof. Gerival Vieira

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
Orientador

## **Dedico**

A meus pais,  
Cleide Terezinha Carnevalli Dias e Carlos Wagner da Silva Dias.

A meu conselheiro e amigo  
Wagner Campos Otoni

## Agradecimentos

Agradecer é um privilégio, afinal se agradecemos é porque vivemos bons momentos e aquilo por que passamos valeu a pena e nos fez crescer. Dessa forma, deixo aqui meus agradecimentos:

A Deus pelo milagre e mistério da vida.

A meus pais pela confiança, disponibilidade e por ter me dado as condições para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa pela vida e amadurecimento aqui passado e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal: Ângelo, Ilza e Beth, pela disponibilidade e atenção dispendida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter fomentado minha ânsia de conhecimento me provendo de recursos financeiros.

A meu irmão Cláudio e minha irmã Mônica, pela amizade e carinho que nos une.

Aos “irmãos” da república: Pedro, Tiago, Bruno e Guilherme, pela amizade, irmandade, desabafos e momentos compartilhados.

À família do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e alunos vinculados: Andréa, Andréia Lima, Ana Rossi, Ana Paula Ribeiro, Ana Paula, Ana Cláudia, Takeshi, Maurecilne, Daniela, Felipe, Samuel, Maria Luiza (Malú), Letícia, Lourdes, Fernanda, Silvano, Elisa, Fabiana, Luciano, Poliana, Jaqueline, Lívia, Tércio, Adelmo (Juninho) e todos aqueles que passaram nestes sete anos de convivência e paciência, e em especial, a técnica Elisonete Garcia Lani (Lili) pelo carinho e por ser minha segunda mãe.

A grande amiga Ana Paula de Oliveira Ribeiro pela imprescindível ajuda nas análises estatísticas.

A turma de pós-graduação da Fisiologia Vegetal, pela convivência, e a turma do “fundão”: Malú, Letícia, Ricardo, Lílian, Eduardo, Éber, Luciana, e em especial, Fernanda e Fran, pela amizade, confraternizações, sessões de cinema e cervejadas e por compartilhar que o conhecimento vai muito além dos livros e que não existe conceito que supere a ética.

Ao meu orientador Prof. Wagner Campos Otoni pela confiança em mim depositada a sete anos. Por sempre acreditar e me incentivar, pela enorme amizade e respeito, e pelo excelente exemplo de pessoa.

A meus conselheiros, Prof. Sérgio Motoike, pelas sugestões e disponibilidade.

A Prof<sup>a</sup>. Eny lochevet Segal Floh pela ajuda com as poliaminas, pela amizade, sugestões e por abrir novos horizontes. Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Celular (BIOCEL-USP), pela ajuda essencial nas quantificações de poliaminas, em especial Claudete e Vanildo, pela paciência nos ensinamentos.

Ao Prof. Raimundo Santos Barros pelo imprescindível auxílio nos estudos com etileno e aos amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas: Bráulio, Carol, Rosana, e em especial, Dimas, pela amizade e grande ajuda.

Aos amigos de outros laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), especialmente da Patologia Florestal. Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pelo suporte durante a pesquisa na graduação e Márcia Brandão (Marcinha) pela amizade e inúmeras ajudas.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo auxílio nos trabalhos e pelo companheirismo, a técnica Vânia, pela disponibilidade em ajudar, e em especial, Lourdes e Marcela, sem as quais não teria sido possível o preparo dos cortes em tempo hábil.

Aos amigos que estavam perto e aqueles que, mesmo distantes, estiveram sempre comigo.

A todos que compartilharam de alguma forma dessa breve e intensa caminhada, pelo que levo e pelo que deixo.

**Muito Obrigado!!**

## **Biografia**

LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS, filho de Carlos Wagner da Silva Dias e Cleide Terezinha Carnevalli Dias, nasceu em 13 de maio de 1980, na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais.

Graduou-se em Agronomia em agosto de 2003 pela Universidade Federal de Viçosa. Iniciou seu mestrado em Fisiologia Vegetal em março de 2004 na mesma instituição, tendo defendido tese em fevereiro de 2006.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Introdução Geral</b> .....	<b>1</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>5</b>

### Capítulo 1

---

#### **Caracterização de espécies de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Masters e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) quanto aos níveis de etileno e poliaminas ao longo do período de indução de morfogênese**

1- Introdução .....	8
2- Material e Métodos .....	10
3- Resultados	
3.1- Morfogênese em <i>Passiflora cincinnata</i> e <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....	14
3.2- Morfogênese em meio indutor de organogênese e meio indutor de calogênese em <i>Passiflora cincinnata</i> .....	18
4- Discussão .....	23
5- Referências Bibliográficas .....	27

### Capítulo 2

---

#### **Influência do precursor (ACC), de inibidores (AVG e STS) e do seqüestrador de etileno (PM) sobre a capacidade morfogênica e níveis endógenos de poliaminas e etileno em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* Masters**

1- Introdução.....	31
2- Material e Métodos.....	35
3- Resultados.....	37
4- Discussão.....	48
5- Referências Bibliográficas.....	52

## Capítulo 3

---

### **Influência de poliaminas e de seu inibidor sobre a capacidade organogênica e níveis endógenos de poliaminas e etileno em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* Masters**

1- Introdução.....	56
2- Material e Métodos.....	59
3- Resultados.....	60
4- Discussão.....	69
5- Referências Bibliográficas.....	72
<b>Conclusões Gerais.....</b>	<b>75</b>

## Resumo

DIAS, Leonardo Lucas Carnevalli, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Influência do etileno e de poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* do maracujá (*Passiflora sp.*)**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Eny lochevet Segal Floh, Raimundo Santos Barros e Sérgio Yoshimitsui Motoike.

O presente trabalho teve por objetivo investigar as possíveis inter-relações entre etileno e poliaminas sobre a capacidade morfogênica de explantes de hipocótilo de duas espécies de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener população FB-100). Explantes de hipocótilo retirados de plântulas germinadas *in vitro* foram cultivados em meio contendo sais MS, complexo vitamínico B5, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de inositol, 10% (v/v) de água de coco, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP) e solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel. Os níveis de etileno e poliaminas foram mensurados ao longo do período de indução da organogênese. Concomitantemente, foi realizada a histologia com a fixação do material vegetal em F.A.A. 50% e acompanhamento da ontogênese das gemas adventícias, de forma a se caracterizar os diferentes eventos envolvidos na rediferenciação celular e a regulação dos níveis de poliaminas e etileno. Também foram realizados tratamentos com inibidores (aminoetoxivinilglicina – AVG, tiosulfato de prata - STS), seqüestrador (perclorato de mercúrio – PM) e promotor da produção de etileno (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano - ACC), além da adição de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e de seu inibidor (metilglioxal-bis-guanil hidrazona – MGBG) ao meio de cultivo. Foi observado atraso nas respostas morfogênicas em *P. edulis* f. *flavicarpa* em comparação com *P. cincinnata*, sendo coincidente com o atraso observado nas concentrações de poliaminas e etileno mensurados naquela espécie. As respostas morfogênicas dos explantes foram semelhantes nos tratamentos com inibidores e seqüestrador, sendo observado comprometimento da organogênese apenas no meio de cultivo com adição isolada de ACC. Nos tratamentos com poliaminas não foi observada diferença em relação ao tratamento controle. Todavia, o tratamento com MGBG apresentou respostas semelhantes àquele com ACC levando à redução da resposta morfogênica. Observou-se que culturas em estádios de rediferenciação, caracterizadas por

apresentarem altas taxas de expansão e alongamento, apresentaram níveis elevados de etileno associados a altos níveis de poliaminas, sugerindo que a competição entre as duas rotas biossintéticas é altamente regulada e plástica, e que a interação seria a peça chave para a definição da diferenciação.

## Abstract

DIAS, Leonardo Lucas Carnevalli, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Morphogenesis *in vitro* of passion fruit (*Passiflora* sp.) as affected by ethylene and polyamines.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Eny lochevet Segal Floh, Raimundo Santos Barros and Sérgio Yoshimitsui Motoike.

The present study was conducted to evaluate possible interactions between ethylene and polyamines levels upon *in vitro* morphogenesis of two passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Masters and *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, population FB-100). Hypocotyl-derived segments (average 10 mm length) were cultivated in MS-based medium, with B5 vitamin complex, 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg.L<sup>-1</sup> myo-inositol, 10% (v/v) coconut water, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 6-benzyladenine (BA) ), and solidified with 2.5 g L<sup>-1</sup> Phytigel<sup>®</sup>. Ethylene and polyamines were assayed at different times in culture (3, 6, 9, 12, and 30 d). Aiming to characterize the shoot-buds differentiation histological analyses were performed with previous fixation of the samples in FAA 50%. The effects of ethylene inhibitor, promoter and scavenger (aminoethoxyvinilglycine – AVG, silver tiosulfate – STS, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid – ACC, and mercury perchlorate- MP, respectively), polyamines (spermine, spermidine and putrescine) and its inhibitor (methylglyoxal-bis-guanylhydrazone - MGBG) were also analysed. A delayed organogenic response occurred in explants of *P. edulis* f. *flavicarpa* as compared to *P. cincinnata*, though coincident with a delayed detection of ethylene and polyamine in cultures of the former. Similar morphogenic responses were observed in explants cultured onto AVG- or MP-supplemented medium, whereas ACC-treated cultures impaired organogenic responses. Polyamine-supplemented cultures displayed morphogenic responses similar to those from control treatment. However, MGBG similarly to ACC lessened the morphogenic responses. Interestingly, explants at redifferentiation stages displayed high expansion and elongation rates, linked to elevated ethylene and polyamine, suggesting that competition between their biosynthetic pathways is highly regulated and plastic, and that these interactions may play a key role in differentiation process.

## INTRODUÇÃO GERAL

O maracujá pertence à ordem Passiflorales, tribo Passiflorae e família Passifloraceae, composta de 18 gêneros e aproximadamente 630 espécies (Cunha e Barbosa, 2002). As espécies de maracujá são consideradas perenes em sua grande maioria, mas existem espécies anuais em pequeno número, como é o caso de *Passiflora gracilis* (Vanderplank, 1996; citado por Cunha e Barbosa, 2002).

A cultura do maracujazeiro no Brasil tem grande importância pela qualidade de seus frutos ricos em sais minerais e vitaminas, sobretudo, A, C e do complexo B; pelas suas propriedades farmacológicas, como a maracujina, a passiflorine e a calmofilase, especialidades farmacêuticas de amplo uso como sedativo, depurativo, anti-inflamatório e antiespasmódico; e ainda pelo valor decorativo de suas flores (Ferreira e Oliveira, 1991; Lorenzi e Matos, 2002).

A evolução da cultura do maracujá no Brasil se deu de modo rápido. No início da década de 70 o país não figurava nem mesmo entre os principais produtores mundiais e, já no final dessa mesma década, era o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado (São José, 1991). No Brasil, o fruto do maracujá é utilizado, principalmente, para o consumo *in natura* e fabricação de sucos que, além de ser consumido no mercado interno, é também exportado, sendo mercado europeu o principal consumidor do produto brasileiro, adquirindo mais de 90% do suco (Souza *et al.*, 2002).

Embora o gênero *Passiflora* agrupe número tão grande de espécies, poucas são exploradas comercial e industrialmente, sendo *P. alata* Dryander (maracujazeiro doce), *P. edulis* Sims. (maracujazeiro roxo) e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujazeiro amarelo) as principais espécies de frutos comestíveis, sendo esta última a mais importante economicamente e a mais cultivada no mundo (Couceiro, 2002).

Várias espécies têm cultivo e consumo razoavelmente acentuado em regiões brasileiras específicas, entre as quais podemos citar *Passiflora quadrangularis* Linn., *P. mollissima* Bailey, *P. nítida* HBK, *P. caerulea* Linn., *P. laurifolia* Linn., *P. coccinea* Aubl., *P. cincinnata* Mast., *P. linguralis* Juss. e *P. incarnata* Linn. (FRUTAL, 2000; citado por Lombardi, 2003).

*Passiflora cincinnata* Mast. é um genótipo de interesse em programas de melhoramento pois apresenta resistência à doença da parte aérea causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* f. sp. *passiflorae* (Yamashiro, 1991), além de se apresentar como excelente porta-enxerto (Lima e Trindade, 2002). Possui ampla distribuição, principalmente na América tropical, ocorrendo desde o sul da América do Norte até ao sul da América do Sul, ao longo da costa brasileira (Agra *et al.*, 1996, citados por Lombardi, 2003).

Esta espécie é popularmente conhecida como maracujá-mochila, maracujá-do-mato ou maracujá-tubarão. Possui flores muito vistosas, grandes e perfumadas e devido ao crescimento vigoroso e hábito trepador é considerada no litoral do nordeste do país como planta daninha. A espécie é perene e pode chegar até 4,5 m de comprimento, com gavinhas espiraladas. As sementes são ovais, faveoladas e negras (Nunes e Queiroz, 2001).

O maracujazeiro é uma cultura bem estudada em seu cultivo *in vitro*, não se mostrando recalcitrante e respondendo bem à aplicação de reguladores de crescimento, já tendo sido possível fechar o ciclo de micropropagação (Grattapaglia *et al.*, 1991), entretanto, ressalte-se que o potencial propagativo em questão depende da espécie ou da fonte de explante (Apezzato-da-Glória *et al.*, 1999). De maneira geral, a cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora* compreende a conservação de recursos genéticos e a obtenção de plantas transgênicas (Vieira e Carneiro, 2004). Para o gênero, há relatos da organogênese direta que pode ser mediada por diversos explantes não meristemáticos, como segmentos de folhas (Becerra *et al.*, 2004); cotilédones e hipocótilos (Dornelas e Vieira, 1993; Silva, 1998; Hall *et al.*, 2000; Reis, 2001; Lombardi, 2003, Fernando, 2005), gavinhas (Dornelas e Vieira, 1994) e internódios (Biasi *et al.*, 2000).

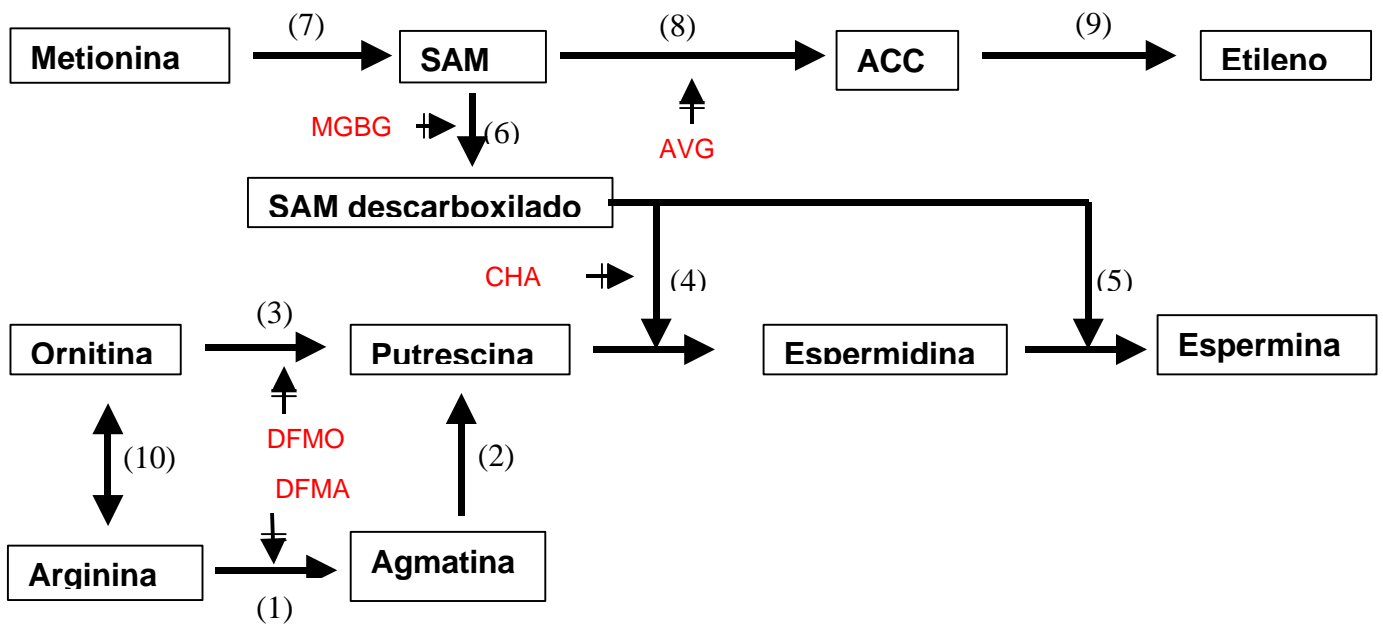
O gênero *Passiflora* tem despertado o interesse crescente por parte da comunidade científica em desenvolver trabalhos em várias áreas do conhecimento, dentre elas a genética, a botânica, a fisiologia vegetal e a biotecnologia. Nesse sentido, o conhecimento e o domínio das técnicas de cultura de tecidos e morfogênese *in vitro* são de grande importância como técnica auxiliar no desenvolvimento de estudos de clonagem, caracterização e incorporação de genes relacionados à resistência a viroses, bacterioses, e, sobretudo, daqueles envolvidos no controle do processo de maturação dos

frutos, pela manipulação de genes envolvidos na biossíntese de etileno (Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2001).

Dado à natureza climatérica dos frutos da espécie (Pocasangre-Enamorado *et al.*, 1995; Shiomi *et al.* 1996a, b), alguns trabalhos já mostraram também a sensibilidade dos explantes de maracujazeiro ao etileno (Barbosa *et al.*, 2001; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2003). Portanto, o maracujazeiro poderá tornar-se um modelo importante que contribuirá para o melhor entendimento de aspectos da senescência influenciada pelo etileno, bem como da influência desse hormônio vegetal sobre os processos morfogênicos.

Considerando-se que as vias biossintéticas do etileno e das poliaminas podem competir por um precursor comum, S-adenosil metionina (SAM) (Alpebaum *et al.*, 1981), é importante avaliar e caracterizar os níveis de poliaminas ocorrentes nos explantes cultivados em presença de promotores ou inibidores do etileno (Pua, 1999).

Uma vez que a rota biossintética destas duas substâncias é quase totalmente conhecida, tendo-se conhecimento a respeito das drogas e etapas onde se pode intervir (Figura 1), torna-se possível a manipulação dos níveis de poliaminas pela adição de inibidores e promotores de seu metabolismo ao meio de cultura sendo uma ferramenta interessante para estudos da interação entre poliaminas e etileno.



**Figura 1** – Rotas de biossíntese de poliaminas e etileno. As enzimas envolvidas são: (1) descarboxilase da arginina; (2) iminohidrolase da agmatina; (3) descarboxilase da ornitina; (4) sintase da espermidina; (5) sintase da espermina; (6) descarboxilase da SAM; (7) sintase da SAM; (8) sintase do ACC; (9) oxidase do ACC; (10) arginase. Em vermelho estão representados os inibidores e seus respectivos pontos de ação: DFMA, DL- -difluorometil arginina; DFMO, DL- -difluorometil ornitina; CHA, ciclohexalamina; MGBG, metilgloxal-bis-guanil hidrazona; AVG, aminoetoxivinilglicina (Modificado de Martin-Tanguy, 2001).

Dado as características observadas nas espécies de *Passiflora* no que se refere ao comportamento *in vitro* e por ser uma espécie com grande sensibilidade ao etileno, este trabalho teve como objetivos: (i) estudar as interações etileno-poliaminas na resposta morfogênica em duas espécies de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Masters e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener); (ii) caracterizar a importância das concentrações de poliaminas nos tecidos vegetais durante a aquisição de competência para respostas morfogênicas; e (iii) otimizar o protocolo de indução de organogênese em *P. cincinnata* Masters.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. (1999). Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **34**: 2007-2013.
- ALPEBAUM, A.; BURGOON, A.C.; ANDERSON, J.D.; LIBERMAN, M.; BENARIE, R.; MATTOO, A.K. (1981). Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. **Plant Physiology**, **68**: 453-456.
- BARBOSA, W.M. (1999). **Morfogênese *in vitro* de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Viçosa, UFV. 70p.
- BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A. (2001). Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursors and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, **7**: 47-51.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORAL, G.A. (2004). 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.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. (2000). Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, **57**: 661-665.
- COUCEIRO, M.A. (2002). **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Viçosa, UFV. 95p.
- CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V. (2002). Aspectos botânicos. In: LIMA, A.A. (Ed.) Maracujá – Produção e Aspectos Técnicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 12-15.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. (1993). Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Passiflora amethystina* Mikan and *Passiflora cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, **13**: 103-106.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. (1994). Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **36**: 211-217.
- FERNANDO, J.A. (2005). **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Campinas, UNICAMP. 106p.
- FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. de. Germoplasma de *Passiflora*. (1991). In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp. 24-26.
- GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S.; SILVA, J.R.; MACHADO, M.A. (1991). Cultura de tecidos de Maracujá. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 1991. pp. 61-77.

- HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. (2000). Efficient organogenesis of an Australian passion fruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, **48**: 79-81.
- LIMA, A.A.; TRINDADE, A.V. (2002). Propagação. In: LIMA, A.A. (Ed.) Maracujá – Produção e Aspectos Técnicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. pp. 29-33.
- LOMBARDI, S.P. (2003). **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* Mast.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Piracicaba, ESALQ/USP, 60p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2002). Passifloraceae. In: LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (Eds.) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum. Nova Odessa. pp. 371-374.
- MANOHARAN, K.; GNANAM, A. (1992). Growth stimulation by conditioned medium and spermidine in low-density suspension cultures of rice. **Plant Cell Physiology**, **33**: 1243-1246.
- MARTIN-TANGUY, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regulation**, **34**: 135-148.
- NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. (2001). A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, **1**: 33-46.
- POCASANGRE-ENAMORADO, H.E., FINGER, F.L., BARROS, R.S., PUSCHMANN, R. (1995). Development and ripening of yellow passion fruit. **Journal of Horticultural Science**, **70**:573-576.
- PUA, E.-C. (1999). Morphogenesis in cell and tissue cultures: role of ethylene and polyamines. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (eds.) Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 255-303.
- REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÉGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. (2003). Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **39**: 618-622.
- REIS, L.B. (2001). **Morfogênese in vitro de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Viçosa, UFV. 90p.
- SÃO JOSÉ, A.R. (1991). Propagação do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, pp. 105-134.
- SHIOMI, S., WAMOCHO, L.S., AGONG, S.G. (1996a). Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine. **Postharvest Biology and Technology**, **7**:161-170.
- SHIOMI, S., KUBO, Y., WAMOCHO, L.S., KOAZE, H., NAKAMURA, R., INABA, A. (1996b). Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. **Postharvest Biology and Technology**, **8**:199-207.

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

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; LIMA, A.A.; COELHO, E.F. (2002). Comercialização. In: LIMA, A.A. (Ed.) Maracujá – Produção e Aspectos Técnicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. pp. 91-96.

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

YAMASHIRO, T. (1991). Doenças do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, pp. 198-220

### **Caracterização de espécies de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Masters e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) quanto aos níveis de etileno e poliaminas ao longo do período de indução de morfogênese**

#### **1- INTRODUÇÃO**

*Passiflora cincinnata* Masters é uma liana glabra ou levemente pilosa, de caule cilíndrico. As folhas são palmatipartidas e contêm um par de glândulas peciolares. As flores apresentam sépalas de cor verde na face externa e azul-rosada ou violeta na face interna. As pétalas apresentam as mesmas cores da face interna das sépalas. Os filamentos da coroa apresentam a parte inferior púrpura, parte intermediária listrada de azul-rosado e azul-pálido, parte superior azul-pálido ou escuro. O fruto é globoso ou ovóide, medindo cerca de 5 cm de comprimento e 3 cm de largura (Cunha *et al.*, 2002).

*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener é uma planta sub-lenhosa, de hábito trepador, glabra, de caule cilíndrico ou levemente anguloso quando jovem. Suas folhas, quando adultas, são trilobadas, margem serrada, com face superior lustrosa e pecíolo biglanduloso. As flores apresentam sépalas e pétalas de cor branca e púrpura na base. Os filamentos da coroa são em quatro ou cinco séries. O fruto é globoso, de cor amarela quando maduro. Esta espécie é nativa da América do Sul, sendo cultivada no Havaí, Quênia, Índia, Austrália, Caribe e Brasil (Cunha *et al.*, 2002).

Ambas espécies foram anteriormente estudadas com relação ao seu comportamento *in vitro* (Dornelas e Vieira, 1994; Lombardi, 2003; Becerra *et al.*, 2004; Isutsa, 2004; Guzzo *et al.*, 2004; Fernando, 2005; Trevisan e Mendes, 2005), sendo que a maioria dos trabalhos realizados com o gênero *Passiflora* foram com *P. edulis* f. *flavicarpa*. Contudo, *Passiflora cincinnata* é uma espécie com alta resposta morfogênica *in vitro* mostrando elevada frequência de formação de gemas adventícias (Dornelas e Vieira, 1993; Lombardi, 2003) sendo uma das poucas espécies de *Passiflora* na qual foi observada embriogênese somática (Reis, 2005), apresentando-se assim como um bom modelo para estudos morfogênicos.

Recentemente, o conceito de inter-relação entre os hormônios tem atraído a atenção com a idéia de que as rotas de sinalização entre os hormônios interagem em uma complexa rede de transferência informacional na qual uma variedade de estímulos desencadeia múltiplas respostas, constituindo uma rede de sinalização cruzada (Chow e McCourt, 2004).

Poliaminas e etileno são duas classes de hormônios que apresentam ampla gama de funções relacionadas ao crescimento e desenvolvimento vegetal. A interação se dá em diversos níveis, sendo que relatos de diversos autores muitas vezes apresentam-se contrastantes (Pua, 1999).

A biossíntese de etileno e poliaminas envolve a incorporação de um grupo aminopropil do S-adenosilmetionina (SAM) sendo que sob certas condições, a competição pelo SAM pode ser um fator de restrição para a produção de etileno ou poliaminas (Buchanan *et al.*, 2000).

Segundo Lee e colaboradores (1997) as poliaminas inibem a produção de etileno pela redução da atividade da sintase do ACC e da oxidase do ACC. Ao passo que, segundo Roustan e colaboradores (1993), o etileno pode inibir a formação de poliaminas pela redução da atividade da descarboxilase da arginina (ADC) e descarboxilase do SAM (SAMDC).

De forma a se ter uma configuração pontual das ações das duas classes de substâncias, associada a uma observação quantitativa das concentrações requeridas, o presente trabalho teve como objetivo, a caracterização das concentrações de poliaminas e etileno ao longo do período de indução da morfogênese, acompanhado por uma visualização dos eventos ontogênicos.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Para a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener foram utilizadas sementes da população FB-100 Maguary, cedidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda (Araguari, MG). Esse material foi melhorado para atender as demandas da indústria de suco (Vieira e Carneiro, 2004).

Da espécie *Passiflora cincinnata* Mast. foram utilizadas como fontes de explantes, sementes maduras obtidas de frutos oriundos de polinização aberta e fornecidos pelo Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. A extração das sementes deu-se de acordo com o protocolo proposto por Tsuboi e Nakagawa (1992). Após a extração manual do suco, as sementes foram postas para fermentar em sua própria polpa, em recipiente plástico e à temperatura ambiente, por um período de três dias. Em seguida, as sementes foram friccionadas com areia lavada até que toda mucilagem do arilo fosse retirada e postas para secar à sombra, em ambiente de laboratório, por três dias.

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

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

A germinação deu-se no escuro, sendo que após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . As plantas permaneceram nessa condição por quinze dias adicionais.

Sob condições assépticas, hipocótilos de plântulas com 30 dias foram excisados, sendo subdividido em cinco explantes (cada explante com aproximadamente 10 mm de comprimento) por plântula, e inoculados em meio de cultura, consistindo de sais MS, complexo vitamínico B5,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol, 10% (v/v) de água de coco,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup> (Sigma Chemical Company, USA), acrescido de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP), sendo o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Verteu-se 20 ml de meio em frascos de vidro (60 x 60 mm, 125 ml de capacidade) do tipo “baby-food jars” (SamaVidros, São Paulo, Brasil), sendo autoclavados a  $120^\circ\text{C}$ ,  $1,1 \text{ Pa}$  por 20 min.

Para a espécie *P. cincinnata*, além do meio de indução de organogênese, foi utilizado um meio indutor de calogênese, consistindo este de sais MS, complexo vitamínico B5,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de mio-inositol,  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup>, acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  (Silva<sup>1</sup> - comunicação pessoal).

Cada frasco constituiu uma repetição sendo cinco repetições por tratamento. Os frascos foram vedados com duas camadas de filme plástico de PVC transparente (Rolopac<sup>®</sup>, Brasil), no qual foram fixados septos de silicone para a retirada das amostras da atmosfera interna. Os tratamentos referem-se ao tempo de exposição ao meio de cultivo e período de quantificação, sendo 0; 3; 4; 5; 6; 9; 12; 18; 24 e 30 dias.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil).

---

<sup>1</sup> SILVA, M.L. – Docente da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT)

Ao longo de trinta dias foram determinados os níveis de poliaminas nos explantes e de etileno emanado pelos explantes vegetais.

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, foi utilizado equipamento de cromatografia gasosa Hewlett-Packard 5890, series II, equipado com coluna de aço inoxidável empacotado com Poropak-N (80-100 mesh), de 3,2 mm de diâmetro interno e 1,5 m de comprimento, tendo como fase móvel o nitrogênio, com fluxo de 30 ml s<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi de 60 °C, 75 °C a do injetor e 135 °C no detector de ionização da chama, e temperatura ambiente de 25 ± 1°C. A injeção da amostra no equipamento foi feita utilizando-se seringa para insulina de 1cm<sup>3</sup> com agulha tipo 29G de ½ polegada (B-D, Becten Dickinson and Company, EUA). Após a determinação do etileno acumulado, os frascos foram abertos em capela de fluxo laminar, por 30 min, e novamente vedados com duas camadas de filme plástico. Realizou-se nova leitura após 24 horas para o cálculo da taxa de produção. O etileno acumulado foi expresso em pmol g<sup>-1</sup> de matéria fresca e a taxa de produção em pmol. h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

A quantificação de poliaminas foi realizada no Laboratório de Biologia Celular (BIOCEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, de acordo com a metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004). O fracionamento das poliaminas foi realizado em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de 5 µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). O fluxo de corrida foi de 1 ml min<sup>-1</sup> a 40 °C, sendo o detector de fluorescência calibrado para 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão).

Foram realizados estudos anatômicos nos explantes de cada tratamento a fim de rastrear os processos de desdiferenciação e rediferenciação de meristemóides a partir dos explantes hipocotiledonares. As amostras foram coletadas e fixadas em F.A.A 50 % (formol: ácido acético: álcool etílico 50%) por 24h. Em seguida foram lavadas em álcool 70%, desidratadas em série alcoólica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). As secções (8 µm de espessura) foram obtidas utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), equipado com navalha de aço descartável. A coloração foi feita com Azul de Toluidina a pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981), por 10 minutos. As lâminas foram montadas em resina sintética Permound<sup>®</sup>. As observações e

os registros fotográficos foram realizados em microscópio Olympus AX70, com sistema U-Photo, do Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

Os dados da mensuração de etileno foram submetidos a análise de variância e para a comparação das médias foi realizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, sendo o experimento montado em fatorial simples, em que as repetições foram escolhidas por meio de sorteio. Os dados referentes às poliaminas foram analisados a partir da média e desvio padrão.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1- Morfogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*

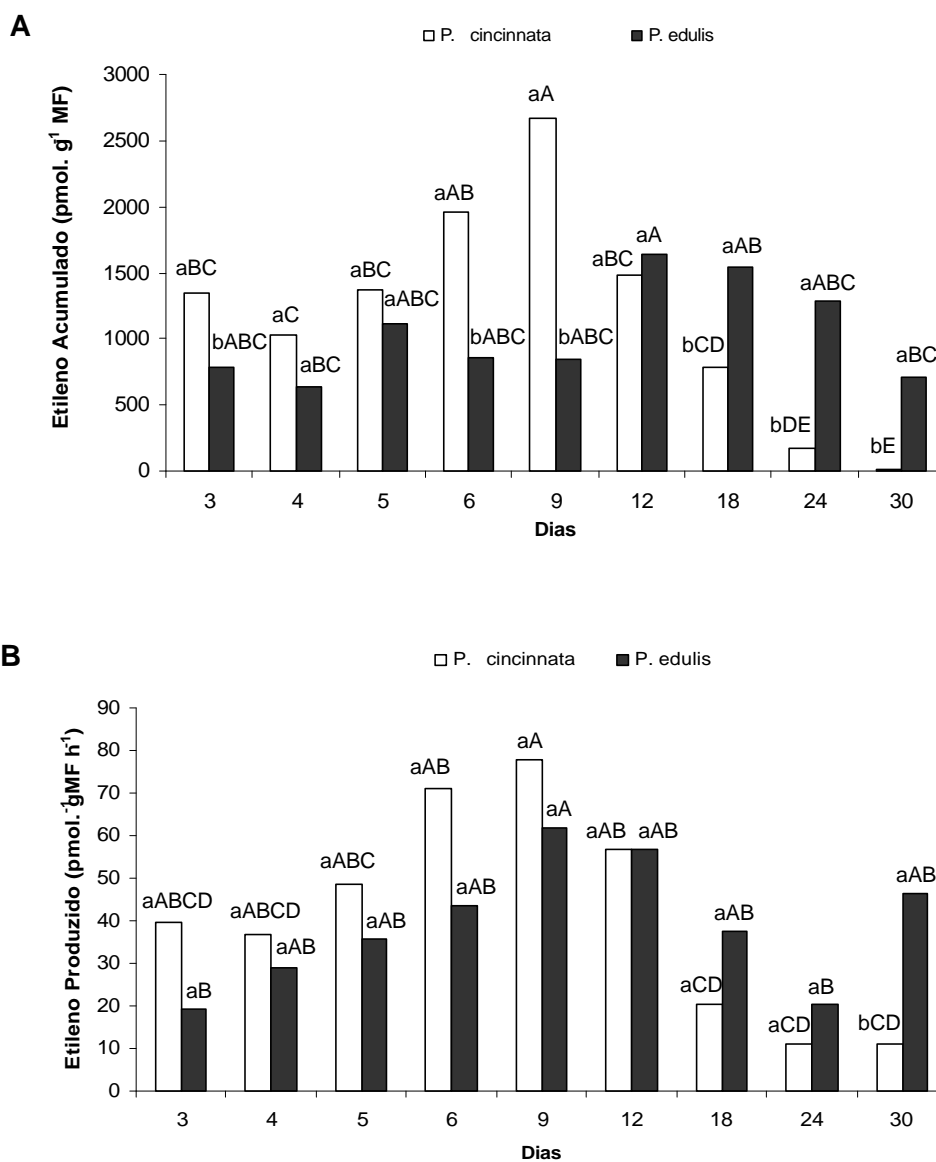
*Passiflora cincinnata* apresentou maior intensidade de resposta em relação a *P. edulis* f. *flavicarpa*. Pode-se observar macroscopicamente um atraso ao que se refere à resposta morfogênica em *P. edulis* f. *flavicarpa* comparativamente à *P. cincinnata*, sendo que para esta espécie a formação de gemas ocorreu por volta do nono dia ao passo que para *P. edulis* f. *flavicarpa* este evento ocorreu por volta do 12º dia de cultivo.

Foi possível verificar divisões celulares nas células do parênquima cortical e medular adjacentes à região vascular e próximas à superfície de seccionamento do explante, notadamente na extremidade distal (Figura 2A e B). Esse processo contínuo de divisão celular originou áreas meristemáticas periféricas, apresentando divisões intensas nas camadas epidérmicas e subepidérmicas dos explantes. Apesar de que em ambas espécies as divisões celulares se mostraram intensas ao terceiro dia, em *P. cincinnata* a rediferenciação ocorreu precocemente observando-se a formação de meristemóides ao sexto dia (Figura 2C) que evoluíram para gemas ao nono dia (Figura 2E). Ao contrário, em *P. edulis* f. *flavicarpa* observou-se formação semelhante a partir do nono dia de cultivo (compare Figura 2C e D) sendo que dessas houve formação de gemas aos 12 dias de cultivo (Figura 2F). A expressão morfogênica progrediu na periferia dos explantes, para estruturas organogênicas (Figura 2E e F). Na periferia do calo, pode-se observar a formação de nódulos vasculares estabelecendo a conexão vascular do calo com as estruturas organogênicas.

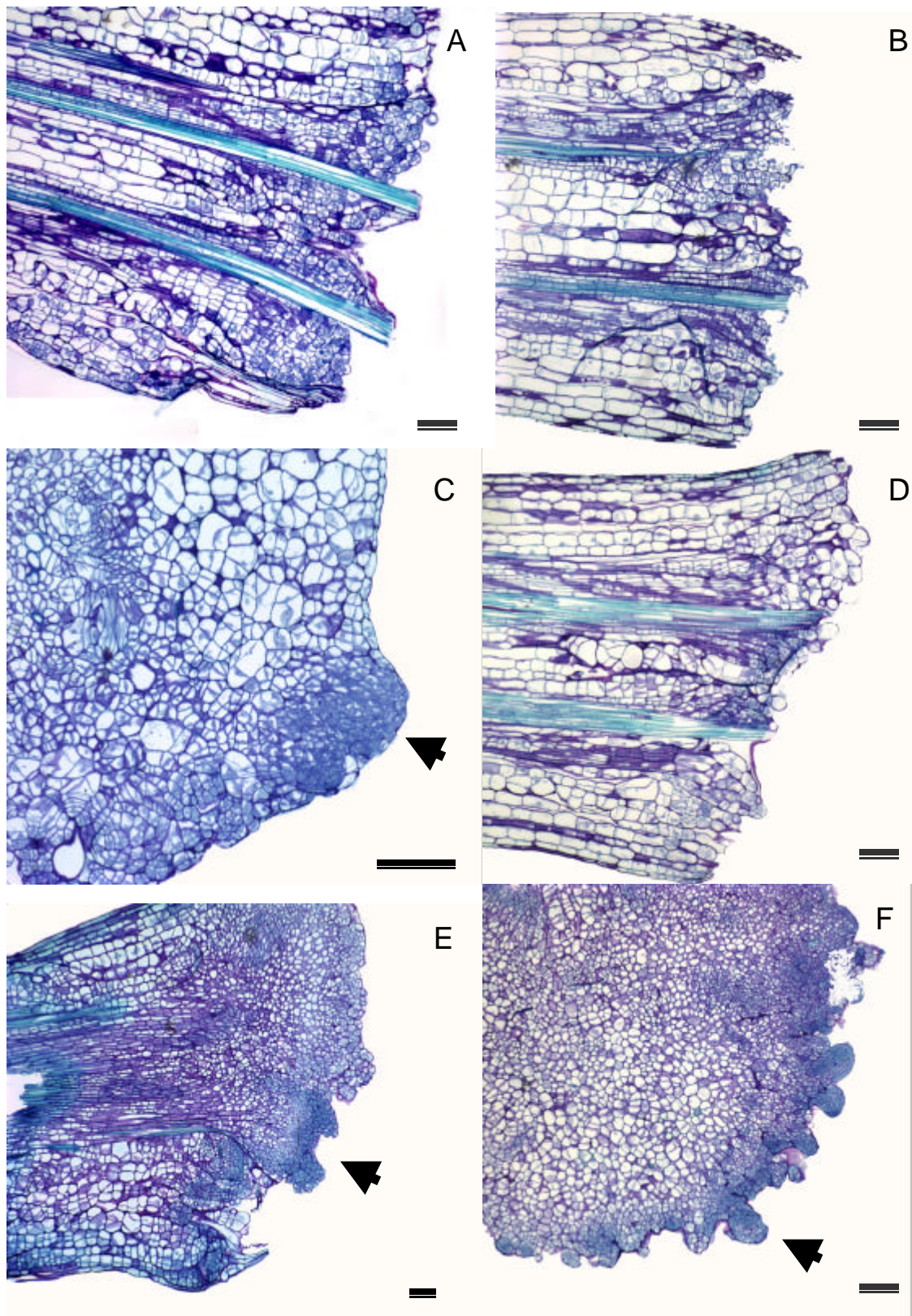
O acompanhamento dos conteúdos de poliaminas e etileno ao longo do período de morfogênese permite acompanhar as alterações ao longo das etapas da transdiferenciação. Fukuda (1997) propõe que o processo de transdiferenciação pode ser dividido em 3 etapas: a primeira envolveria o processo de desdiferenciação, a segunda etapa envolveria a expressão da totipotencialidade das células desdiferenciadas, e a última envolveria os eventos específicos de formação do órgão ou tecido.

Com relação aos níveis de etileno, para *P. cincinnata* observou-se um incremento no etileno acumulado até o nono dia de cultivo com posterior decréscimo, sendo os níveis máximos bem superiores aos apresentados por *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os níveis de etileno produzido tiveram seu pico por volta do sexto ao nono dias de cultivo (Figura 1A e B). Para *P. edulis* f. *flavicarpa* observou-se incremento nos níveis de etileno até o décimo segundo dia de cultivo, sendo que após este período inicia-se o decréscimo no seu acúmulo. Os níveis de etileno produzidos seguiram padrão semelhante, sendo que o pico de produção ocorreu ao nono dia.

Notou-se que o atraso nos níveis máximos de acúmulo de etileno, observado para *P. edulis* f. *flavicarpa* em relação a *P. cincinnata*, coincidiu com o atraso observado nas respostas organogênicas.



**Figura 1**– Níveis de etileno mensurados em *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. **A** – Níveis de etileno acumulado. **B** – Níveis de biossíntese de etileno. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As letras minúsculas referem-se à comparação entre espécies enquanto as maiúsculas referem-se aos dias.



**Figura 2** – Cortes histológicas longitudinais, mostrando o extremo distal de explantes de hipocótilos de maracujazeiros: **A, C e E:** *Passiflora cincinnata* aos 3°, 6° e 9° dias de cultivo *in vitro*, respectivamente; **B, D e F:** *P. edulis f. flavicarpa* aos 3°, 6° e 12° dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Setas indicam o desenvolvimento de gemas adventícias. Barras= 200 μm.

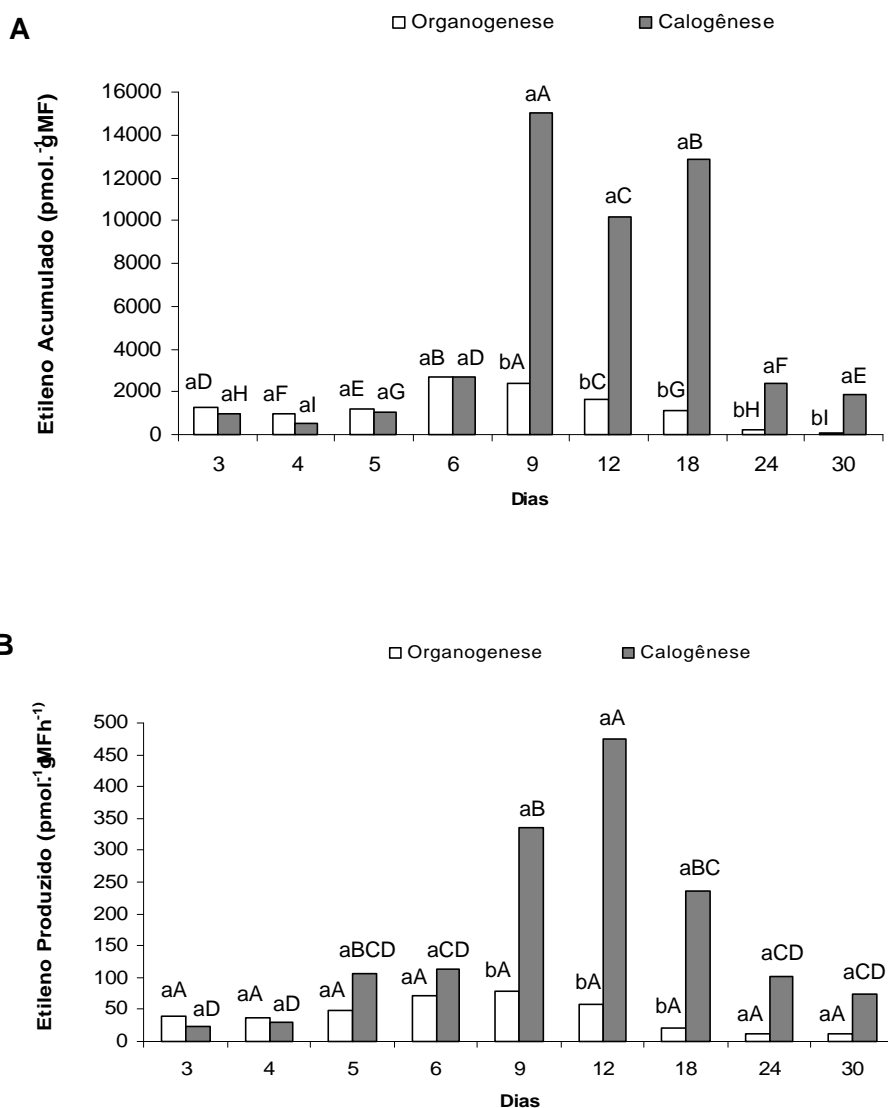
No tocante as poliaminas, *Passiflora edulis f. flavicarpa* apresentou um maior nível de espermidina e espermina, exibindo os picos de concentrações de ambas poliaminas ao décimo oitavo dia de cultivo, aliada a uma elevada taxa de conjugação. Por seu turno, *P. cincinnata* apresentou maiores níveis de putrescina e níveis baixos das demais poliaminas resultando em alta relação PUT/(SPD + SPM) no décimo oitavo dia de cultivo (Figura 4 e 5). *P. edulis f. flavicarpa* apresentou menor variação nos níveis de putrescina durante a organogênese, observando-se seus maiores níveis do 5° ao 12° dia.

Os níveis de poliaminas totais em *P. cincinnata* apresentaram pico de concentração entre o sexto e nono dias de cultivo, sendo que os níveis totais em *P. edulis f. flavicarpa* apresentaram incremento no quinto dia com tênue decréscimo ao longo do período de indução (Figura 5).

### **3.2- Morfogênese em meio indutor de organogênese e meio indutor de calogênese em *P. cincinnata***

Para o meio indutor de calogênese foi observada a formação de calejamento intenso, principalmente a partir do sexto dia de cultivo com a formação de calos de coloração esbranquiçada e consistência friável. A diferenciação de estruturas definidas nestes calos não foi observada.

As concentrações de etileno observadas no meio de calogênese mostraram-se, a partir do nono dia, bem superiores àquelas apresentadas pela cultura no meio de organogênese (Figura 3). Os maiores níveis de acúmulo de etileno para o meio de calogênese ocorreram ao nono dia de cultivo, sendo que foi observado um incremento de 6 vezes daquela concentração mensurada ao sexto dia. O pico de produção foi observado no décimo segundo dia sendo aproximadamente 10 vezes superior ao observado no meio indutor de organogênese.

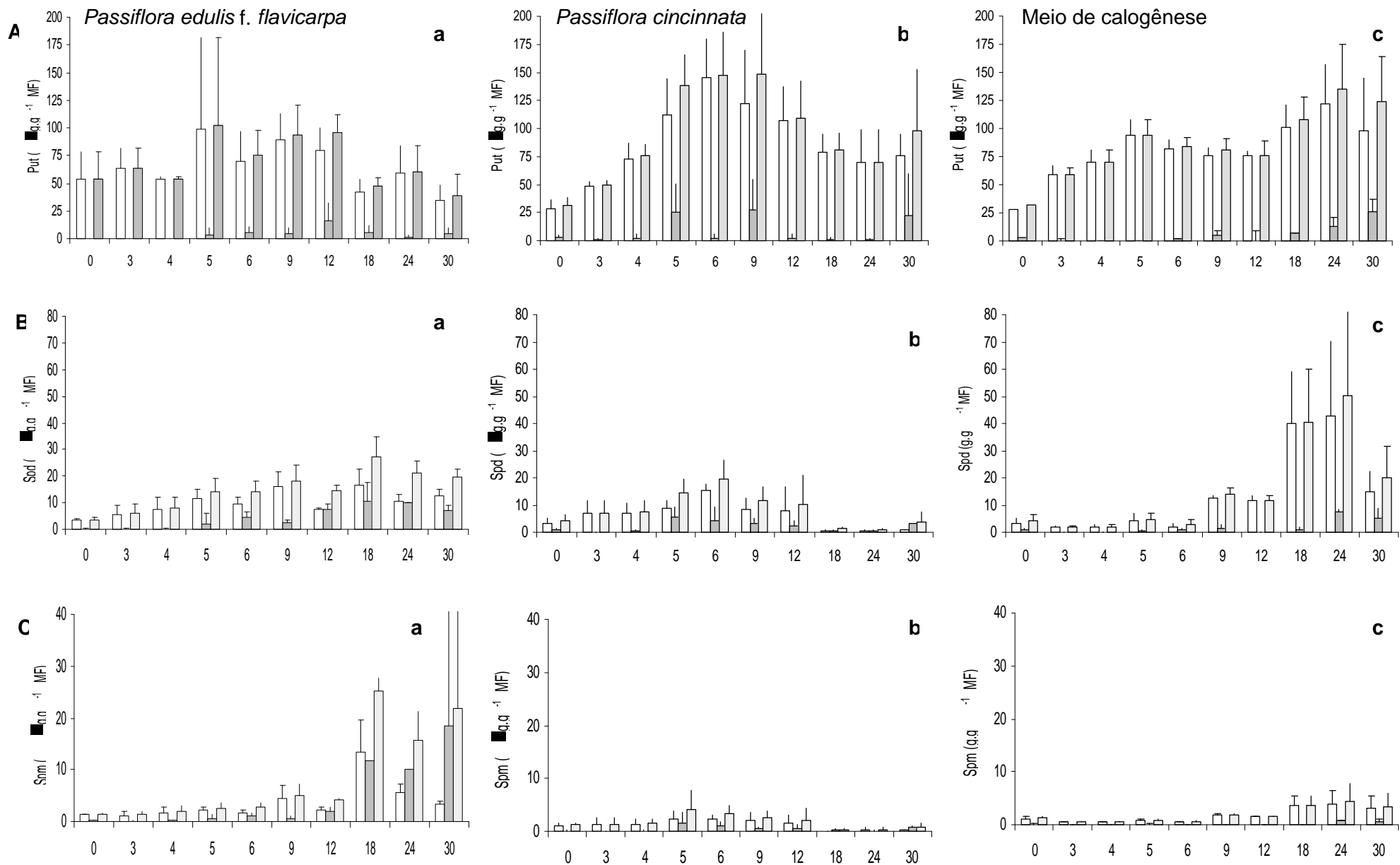


**Figura 3** – Níveis de etileno mensurado nos meios de organogênese e calogênese em *Passiflora cincinnata*. **A** - Níveis de etileno acumulado. **B** – Níveis de biossíntese de etileno. Médias com letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As letras minúsculas referem-se a comparação entre espécies enquanto as maiúsculas referem-se aos dias.

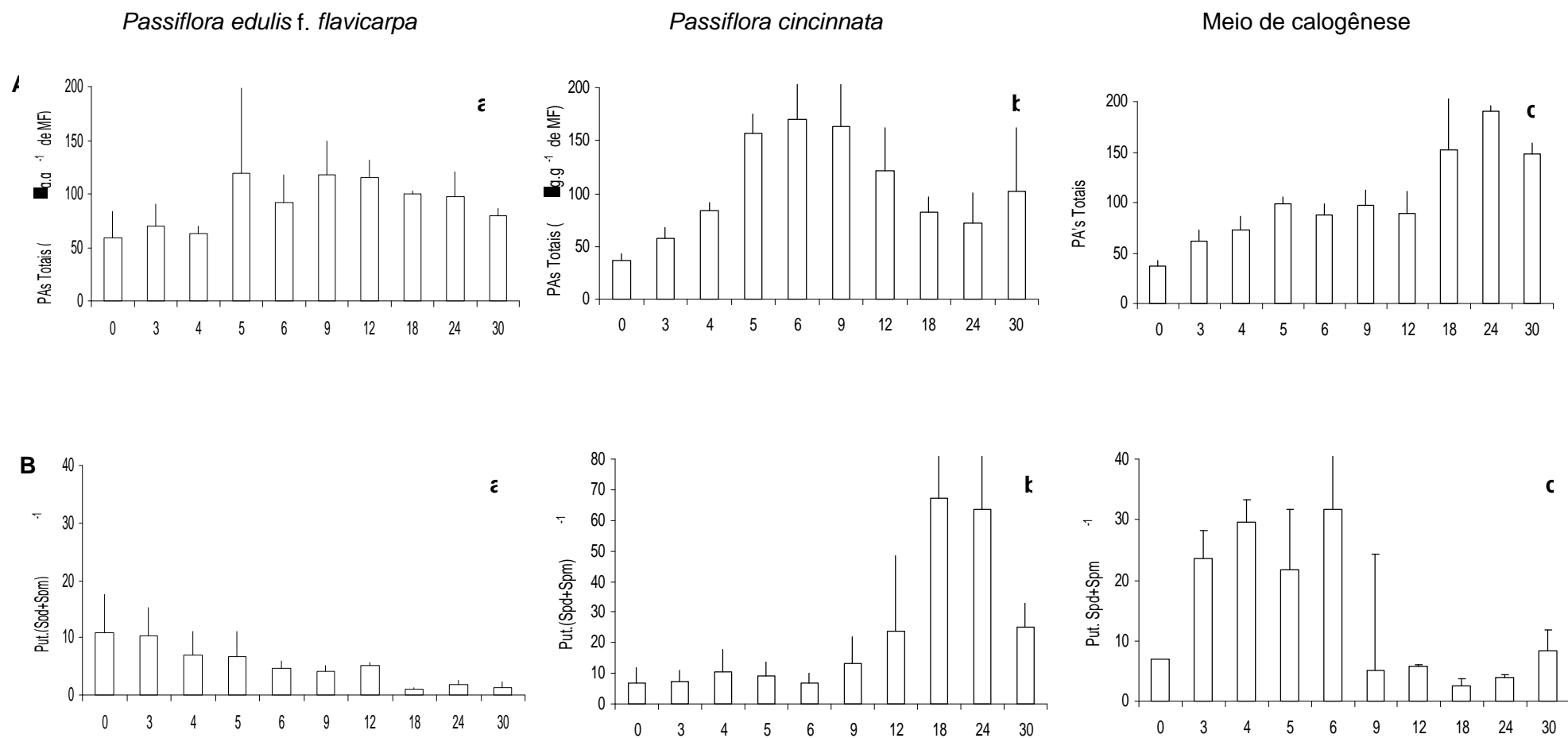
Com relação aos níveis de putrescina, enquanto no meio indutor de organogênese observou-se um pico por volta do nono dia, em meio indutor de calogênese observou-se um aumento no período final dos trinta dias (Figura 4).

Os níveis de espermidina atingiram seu máximo no meio de calogênese em que se apresentaram duas vezes maiores que o nível máximo apresentado no meio indutor de organogênese. Os níveis de espermina, por sua vez, apresentaram uma elevação no período final (Figura 4).

Os níveis de poliaminas totais no meio de calogênese apresentaram incremento na fase final de cultivo acompanhado de redução da razão PUT/(SPD + SPM) (Figura 5). É interessante observar que a relação PUT/(SPD + SPM) mostrou-se elevada nos períodos iniciais de cultivo, justamente aqueles caracterizados por intensa divisão celular (Figura 2).



**Figura 4** – Níveis de poliaminas ao longo do período de indução e resposta morfogênica em explantes de hipocótilo. **A** – Putrescina; **B** – Espermidina; **C** – Espermina; **a)** *P. edulis f. flavicarpa*; **b)** *P. cincinnata*; **c)** meio de calogênese. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



**Figura 5** – Níveis de poliaminas totais e razão PUT/(SPD + SPM) ao longo do período de indução e resposta morfogênica em explantes de hipocótilo.

**A** – Poliaminas Totais; **B** – Razão PUT / (SPD + SPM); **a)** *P. edulis f. flavicarpa*; **b)** *P. cincinnata*; **c)** meio calogênese.

#### 4- DISCUSSÃO

Vários trabalhos têm verificado a relação entre diferentes capacidades morfogênicas dentro de uma mesma espécie e seus níveis de poliaminas e etileno (Pua, 1999; El Meskaoui e Tremblay, 2001; Shoeb *et al.*, 2001; Li e Burritt, 2003; Zapata *et al.*, 2004). No presente trabalho verificou-se que o atraso na expressão da organogênese observado em *P. edulis* f. *flavicarpa* em relação à *P. cincinnata* coincidiu com o atraso observado nos picos de concentração de etileno e poliaminas totais.

No presente trabalho, foi observado que as respostas morfogênicas iniciaram-se a partir de divisões proliferativas na região do feixe vascular a partir do terceiro dia de cultivo, tanto em *P. cincinnata* quanto em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Todavia, para *P. cincinnata* a formação de meristemóides ocorreu por volta do sexto dia enquanto que para *P. edulis* ocorreu por volta do nono dia. Os padrões de divisão celular observados são condizentes com aqueles relatados por Fernando (2005) para plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* da mesma população (FB-100).

Para a visualização das gemas, o período observado no presente trabalho está coerente com os relatados por outros autores. (Apezzato-da-Glória *et al.*, 1999; Reis, 2001; Lombardi, 2003; Reis, 2005). Lombardi (2003) em estudo anatômico com segmentos de raiz e plântula de *P. cincinnata* observou a formação de gemas no sétimo dia de cultivo, a partir do periciclo e câmbio vascular, em plantas com estrutura secundária mais avançada. Apezzato-da-Glória e colaboradores (1999), por sua vez, observaram a formação de meristemóides aos 14 dias de cultura em explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

*P. cincinnata* apresentou maior amplitude de variação dos níveis de etileno ao longo do período de indução da organogênese, sugerindo uma regulação temporal precisa, confirmando o proposto por Biondi e colaboradores (1998) em que a função do etileno mostrou-se diferente de acordo com o estágio de desenvolvimento.

Os picos de concentração de etileno ocorreram durante o período de diferenciação dos meristemóides em ambas espécies, sendo coerente com a literatura, uma vez que o principal sítio de síntese de etileno são regiões ricas

em alongamento e expansão celular, tais como nós e primórdios (Taiz e Zeiger, 2004). Zhu e Chen (2005) em cultura de cotilédones de pepino observaram o pico de produção de etileno por volta do 10° dia de cultivo sendo que houve observação macroscópica das gemas no 15° dia.

Park e Lee (1994) sugeriram que nos estádios iniciais de cultivo seria mais importante um alto nível de poliaminas inibindo a biossíntese de etileno, ao passo que com o desenvolvimento, seria mais importante níveis mais elevados de etileno e mais baixos de poliaminas. Todavia no presente trabalho verificou-se aumento na biossíntese de ambos durante a resposta morfogênica, sendo o mesmo comportamento observado por Metha e colaboradores (2003) em plantas transgênicas de tomate com expressão do gene da descarboxilase da SAM. Durante a frutificação de certas espécies, o incremento na produção de etileno não é acompanhado de um declínio de putrescina (PUT) (Dios *et al.*, 2006).

Em *P. cincinnata* observou-se o pico de putrescina ao nono dia de cultivo, período de diferenciação dos meristemóides. Diversos trabalhos têm correlacionado picos de poliaminas com altas taxas de divisão e expansão celular. Desai e Metha (1985) observaram em *P. alato-caerulea* o aumento dos níveis de putrescina antes da observação visual da organogênese, sendo observado o pico de concentração de putrescina ao nono dia de cultivo. Faivre-Rampant e colaboradores (2000) observaram que a diferenciação de gemas em tabaco ocorre acompanhada de altos níveis de PUT. Monteiro e colaboradores (2002) observaram a ocorrência de picos de poliaminas, no nono dia de cultivo, em calos embriogênicos de *Panax ginseng*. Li e Burritt (2003) em trabalhos com *Dactylis glomerata* observaram que há aumento do nível de poliaminas totais até o sétimo dia, decrescendo após este período. Os níveis de putrescina e espermidina em cotilédones de pepino decresceram gradualmente durante os primeiros dez dias de cultura, enquanto os níveis de espermina aumentaram rapidamente atingindo um pico ao 14° dia, justamente antes da emergência macroscópica das gemas ao 15° dia (Zhu e Chen, 2005).

Hunter e Burritt (2005) propõem que o acúmulo de poliaminas é induzido durante os estádios iniciais da cultura e é requerida para o sucesso da organogênese, e que o processo de organogênese promove o acúmulo de poliaminas tendo como resultado o incremento da divisão e atividade celular.

No meio para indução de calogênese foi observado o aumento nos níveis de putrescina ao longo de todo período de cultivo, provavelmente ligado a correlação observada por vários autores entre a putrescina e a divisão celular.

Wu e Kuniyuki (1985) observaram que arginina ou poliaminas induziram a divisão celular em protoplastos de amêndoa, sendo PUT a mais efetiva. O acúmulo de poliaminas, especialmente PUT, ocorre em paralelo com aumento da atividade de ADC na fase G1/S e G2/M em cultura de suspensão de *Catharanthus roseus* (Minocha *et al.*, 1991). Puga-Hermida e colaboradores (2003) observaram que o acúmulo máximo de PUT coincidia com o maior crescimento, com células em divisão em culturas de embrião zigótico de *Brassica rapa*. Santa-Catarina (2005) observou uma relação entre o aumento da concentração de poliaminas e a divisão celular de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*.

Em culturas de camadas finas de tabaco, em “programas” de florescimento, gemas e raízes, houve acréscimo no conteúdo de poliaminas, especialmente durante a formação de meristemóides e protusão dos primeiros órgãos (Scaramagli *et al.*, 1999).

Os níveis de espermidina observados no meio de calogênese apresentaram níveis duas vezes maiores que o nível máximo apresentado no meio indutor de organogênese, tal como foi observado por Desai e Metha (1985). Altas e baixas taxas de biossíntese de SPD são correlacionadas com divisão e expansão celular, respectivamente (Paschalidis e Roubelakis-Angelakis, 2005).

Em meios de cultura onde há incremento de alguma auxina, tal como 2,4 – D, é esperado um aumento na biossíntese de etileno, uma vez que as auxinas promovem a sintase do ACC. (Chae *et al.*, 2000).

É interessante notar que no meio de calogênese o pico de etileno ocorre no nono dia de cultivo sendo que os altos níveis foram observados até o 18º dia de cultivo e que os níveis de SPD e SPM apresentaram incremento a partir do nono dia de cultivo, sendo que somente quando os níveis destas duas poliaminas se apresentam elevados, parece haver competição metabólica. Segundo Park e Lee (1994) e Malmberg e colaboradores (1998) devido o fluxo para a síntese de poliaminas ser muito maior que o fluxo para a biossíntese de

etileno, não é de se surpreender que pequenas alterações na síntese de poliaminas tenham profunda influência na síntese de etileno. Li e Wang (2004) observaram que somente em condições elevadas de estresse, há uma competição metabólica entre etileno e poliaminas, sendo que sob altas condições de estresse, há uma ativação da ADC e uma inibição da sintase da espermidina (Aziz. *et al.*, 1997).

Muitos estudos têm enfatizado a razão  $PUT / (SPD + SPM)$  como fator fundamental para a resposta morfogênica (Bajaj, 1995; Kakkar e Nagar, 1997; Shoeb *et al.*, 2001). No presente estudo foi observado no meio indutor de calogênese, alta razão  $PUT/(SPD + SPM)$  nos períodos iniciais de cultivo, sendo estes períodos caracterizados por intensa divisão celular. Para o meio indutor de organogênese verificou-se alta razão nos períodos finais durante o alongamento e proliferação das gemas. Paschadilis e Robelakis-Angelakis (2005) observaram uma maior razão  $PUT/(SPD + SPM)$  no ápice e primeira folha de tabaco, ou seja, regiões que apresentam alta taxa de divisão celular. Liu e colaboradores (2004) consideram que uma baixa relação  $PUT/(SPD + SPM)$  estava relacionada a uma maior tolerância a estresses. Hunter e Burritt (2005) sugerem que o aumento da razão  $PUT/(SPD + SPM)$  após a formação de gemas (7 ao 14 dia de cultivo) em explantes de cotilédone de alface pode funcionar como sinal para o crescimento e desenvolvimento.

É interessante observar que o comportamento dos níveis de biossíntese de etileno e poliaminas são semelhantes, sugerindo que nestas condições não há competição entre as duas rotas, podendo haver uma co-ação entre os dois.

Os resultados encontrados por Zhu e Chen (2005) indicam que grande parte do etileno produzido pelas plantas pode ser redundante para o crescimento e desenvolvimento durante a formação de ramos adventícios, ou os tecidos podem se tornar insensíveis ao etileno, sendo que o efeito promotor das poliaminas não está relacionado com o metabolismo do etileno.

O presente estudo verificou a relação entre etileno e poliaminas na expressão da resposta morfogênica sendo que a diferença temporal de resposta entre duas espécies de maracujá coincidiu com a diferença nos níveis de poliaminas e etileno.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. (1999). Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **34**: 2007-2013.
- AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY, J.; LARHER, F. (1997). Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. **Plant Growth Regulation**, **21**: 153–163.
- BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. (1995). Efficient plant regeneration from long term callus culture of rice by spermidine. **Plant Cell Reports**, **14**: 717-720.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORAL, G.A. (2004). 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.
- BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P. (1998). Ethylene involvement in the vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, **202**: 134-144.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. pp. 895-901.
- CHAE, H.S.; CHO, Y.G.; PARK, M.Y.; LEE, M.C.; EUN, M.Y.; KANG, B.G.; KIM, W.T.; (2000). Hormonal cross-talk between auxin and ethylene differentially regulates the expression of two members of the 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate oxidase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, **41**: 354–362.
- CHOW, B.; McCOURT, P. (2004). Hormone signaling from a developmental context. **Journal of Experimental Botany**, **55**: 247-251.
- CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. (2002) Espécies de maracujá. In: LIMA, A.A. (Ed.) Maracujá – Produção e Aspectos Técnicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp.15-28.
- DESAI, H.V.; MEHTA, A.R. (1985). Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, **119**: 45-53.
- DIOS, P.; MATILLA, A.J.; GALLARDO, M. (2006). Flower fertilization and fruit development prompt changes in free polyamines and ethylene in damson plum (*Prunus insititia* L.). **Journal of Plant Physiology**, **163**: 86-97.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. (1993). Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystine* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, **13**: 103-106.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. (1994). Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **36**: 211-217.
- EL MESKAOUI, A.; TREMBLAY, F.M. (2001). Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. **Journal of Experimental Botany**, **52**: 761-769.

- FAIVRE-RAMPANT, O.; KEVERS, C.; DOMMES, J.; GASPAR, T. (2000). The recalcitrance to rooting of the micropropagated shoots of the *rac* tobacco mutant: Implications of polyamines and of the polyamine metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, **38**: 441-448.
- FERNANDO, J.A. (2005). **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Campinas, UNICAMP. 106p.
- FUKUDA, H. (1997). Tracheary element differentiation. **The Plant Cell**, **9**: 1147-1156.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, **50**:151-158.
- GUZZO, F.; CEOLDO, S. ANDREETTA, F.; LEVI, M. (2004). *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, **61**: 108-113.
- HUNTER, D.C., BURRIT, D.J. (2005). Light quality influences the polyamine content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledon explants during shoot production *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, **45**: 53-61
- ISUTSA, D.K. (2004). Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, **99**:395-400.
- KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K. (1997). Distribution and changes in endogenous polyamines during winter dormancy in tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Journal of Plant Physiology**, **151**: 63-67.
- LI, Z.; BURRIT, D.J. (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. **Plant Growth Regulation**, **40**: 65-74.
- LI, C.; WANG, G. (2004). Interactions between reactive oxygen species, ethylene and polyamines in leaves of *Glycyrrhiza inflata* seedlings under root osmotic stress. **Plant Growth Regulation**, **42**: 55-60.
- LIU, H.P.; DONG, B.H.; ZHANG, Y.Y.; LIU, Z.P.; LIU, Y.L. (2004). Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. **Plant Science**, **166**: 1261-1267.
- LEE, M.M.; LEE, S.H.; PARK, K.Y. (1997). Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. **Journal of Plant Physiology**, **151**: 68-73.
- LOMBARDI, S.P. (2003). **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* Mast.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Piracicaba, ESALQ/USP, 60p.
- MALMBERG, R.L., WATSON, M.B., GALLOWAY, G.L., YU, W. (1998). Molecular genetic analyses of plant polyamines. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **17**: 199-224.
- METHA, R.A.; CASSOL, T.; LI, N.; ALI, N.; HANDA, A.K.; MATTOO, A.K. (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life. **Nature Biotechnology**, **20**: 613-618.

- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; KOMAMINE, A.; SHORTLE, W.C. (1991). Regulation of DNA sintesis and cell division by polyamines in *Catharanthus roseus* suspension cultures. **Plant Cell Reports**, **10**: 126-130.
- MONTEIRO, M.; KEVERS, C.; DOMMES, J.; GASPAR, T. (2002). A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **68**: 225-232
- MONTEIRO-HARA, A.C.B. (2000). **Cultivo in vitro de três espécies do gênero Passiflora**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) Piracicaba, ESALQ/USP, 82p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497.
- O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. (1981). The study of plant structure principles and select methods. Melbourne, Termacarphi LTD. pp.56-58.
- PARK, K.Y., LEE, S.H. (1994). Effects of ethylene and auxin on polyamine levels in suspension-cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, **90**: 382-390.
- PASCHALIDIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (2005). Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. **Plant Physiology**, **138**: 142-152.
- PUA, E.-C. (1999). Morphogenesis in cell and tissue cultures: role of ethylene and polyamines. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Eds.) Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp.255-303.
- PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; MATILLA, A.J. (2003). The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. **Physiologia Plantarum**, **117**: 279-288.
- REIS, L.B. (2001). **Morfogênese in vitro de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Viçosa, UFV, 90p.
- REIS, L.B. (2005). **Morfogênese in vitro e transformação genética de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. cincinnata* Masters)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV, 105p.
- ROUSTAN, J.P.; CHRAIBI, K.M.; LATCHÉ, A.; FALLOT, J. (1993). Relationship between ethylene and polyamine synthesis in plant regeneration. In: PECH, J.C. (Ed.) Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1993, pp. 365-366.
- SANTA-CATARINA, C. (2005). **Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos da embriogênese de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas/ USP. 117p.
- SCARAMAGLI, S.; BIONDI, S.; CAPITANI, F.; GEROLA, P.; ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P. (1999). Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Physiologia Plantarum**, **105**: 367-376.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, **160**: 1229-1235.

SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W.; GUERRA, M.P. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **76**: 53–60.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). Fisiologia Vegetal. 3 Ed. Artmed. Porto Alegre/RS: pp. 541-558.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. (2005). Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Sciencia Agricola**, **62**: 346-350.

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

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

WU, S.C.; KUNIYUKI, A.H. (1985). Isolation and culture of almond protoplast. **Plant Science**, **41**: 55-60.

ZAPATA, P.J.; SERRANO, M.; PRETEL, M.T.; AMOROS, A.; BOTELLA, M.A. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. **Plant Science**, **167**: 781-788.

ZHU, C.; CHEN, Z. (2005). Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **81**:45–53.

## Capítulo 2

---

### **Influência do precursor (ACC), de inibidores (AVG e STS) e do seqüestrador de etileno (PM) sobre a capacidade morfogênica e os níveis endógenos de poliaminas em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata* Masters**

#### **1- INTRODUÇÃO**

Etileno é um hormônio gasoso que pode ser produzido em quase todos os tecidos vegetais, embora a taxa de produção dependa do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento, sendo que, em geral, as regiões meristemáticas e as regiões dos nós são as mais ativas na síntese de etileno (Taiz e Zeiger, 2004).

Apesar de ser freqüentemente associado ao amadurecimento, o etileno está envolvido em diversas etapas do ciclo da planta, tais como, germinação de sementes, crescimento de plântulas, abscisão de folhas e pétalas, senescência de órgãos, respostas a estresses bióticos e abióticos (Schaller e Kieber, 2002) Os efeitos do etileno são erroneamente considerados simples (Taiz e Zeiger, 2004), pois há interação de diversos outros hormônios e cascatas de sinalização.

O etileno afeta a transcrição de genes envolvidos em inúmeros processos biológicos, de metabolismo a transdução de sinais, incluindo degradação de proteínas, transporte de água, peptídeos e íons, metabolismo de parede celular e metabolismo de lipídios (Chen *et al.*, 2005). Além disso, aparenta também estar envolvido na transição da fase vegetativa para reprodutiva (Ogawara, *et al.*, 2003; Chen, *et al.*, 2005).

A biossíntese do etileno ocorre a partir da metionina com sua conversão a S-adenosil-metionina (SAM). A conversão do SAM à ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é a etapa limitante da rota, a qual é catalisada pela enzima sintase do ACC. A última etapa é a conversão do ACC em etileno, onde há necessidade de O<sub>2</sub> e é catalisada pela enzima oxidase do ACC (Buchanan *et al.*, 2000).

A ação da enzima sintase do ACC é regulada por uma família multigênica e por diferentes fatores como auxinas, citocininas e ozônio. A ativação da sintase do ACC pelas citocininas é predominantemente pós-transcricional, ao passo que pelas auxinas é a nível transcricional. A oxidase do ACC, em condições normais, é estimulada sendo o substrato (ACC) o fator limitante (Alonso e Ecker, 2001).

Alguns inibidores da biossíntese do etileno são bastante conhecidos. O aminoetóxi-vinil-glicina (AVG) é um potente inibidor, atuando na sintase do ACC que é a enzima-chave da síntese de etileno. Altas concentrações de íons cobalto inibem a conversão do ACC para etileno. Além desses, a síntese de etileno é inibida pelos inibidores da oxidação, acetilcolina e agentes quelantes, que reduzem o oxigênio necessário para a conversão do ACC em etileno (George, 1993).

Outras substâncias conhecidas inibem a ação do etileno, dentre elas destacam-se os íons prata e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Barbosa, 1999). O CO<sub>2</sub> pode ter efeito inibitório sobre etileno por provocar uma redução no pH reduzindo a ação da oxidase do ACC (Arigita *et al.*, 2005). Baixos níveis de CO<sub>2</sub> regulam a síntese de etileno mediando a síntese da oxidase do ACC e a cinética de seus receptores, ao passo que altos níveis, inibem sua ação possivelmente por interações ao nível de biossíntese. Os íons prata são potentes inibidores da ação do etileno, tendo uma ação bem específica. O íon prata pode substituir o cobre na ligação de alta afinidade impedindo as alterações que normalmente ocorrem na proteína quando o etileno liga-se ao receptor (Taiz e Zeiger, 2004).

A conjugação do ACC pode ter um importante papel no controle da biossíntese do etileno, ao passo que o catabolismo do etileno, aparentemente, não possui papel significativo na regulação dos níveis endógenos (Taiz e Zeiger, 2004).

Via de regra, o etileno não é suplementado, mas invariavelmente se acumula nos recipientes de cultura, sendo que a quantidade acumulada será dependente da taxa de produção dos tecidos e das taxas de trocas gasosas nos recipientes, pois embora os recipientes utilizados permitam a saída relativa de etileno, sua produção freqüentemente excede à perda, resultando em acúmulo (George, 1993; Pua, 1999).

O etileno é um dos reguladores que apresentam grande influência sobre a capacidade de regeneração do material vegetal, seja promovendo ou inibindo os processos morfogênicos em várias espécies, tais como: *Nicotiana tabacum* (Biondi *et al.*, 1998), *Malus domestica* (Ma *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Carvalho *et al.*, 2000), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Barbosa *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2003), *Carica papaya* (Magdalita *et al.*, 1997; Koehler, 2004), *Bixa orellana* (Paiva Neto, 2002) e *Arachis hypogaea* (Ozudogru *et al.*, 2005)

É importante notar que etileno pode ter efeitos inibitórios ou promotores dependendo de sua concentração, existindo um ponto ótimo e um nível limite de concentração em cada caso (Hatanaka *et al.*, 1995).

Linhagens de *Picea mariana* com baixa capacidade embriogênica apresentaram altas taxas de produção de etileno quando comparadas com linhagens de alta capacidade embriogênica, sugerindo que a capacidade de produção de embriões é inversamente relacionada à taxa de produção de etileno (El Meskaoui e Tremblay, 2001).

Jona e colaboradores (2002) observaram que tanto para espécies climatéricas quanto não climatéricas, em um curto período, o etileno é benéfico para a planta. Estes autores observaram que inicialmente o etileno promoveu a síntese de clorofila, propondo que, como o etileno é antagonista das auxinas, seu efeito seria consequência da diminuição da concentração de auxinas e alteração do balanço auxinas:citocininas.

Um das dificuldades no estudo do etileno se deve ao fato que o etileno liberado pode tanto ativar autocataliticamente sua produção, como inibi-la (Arigita *et al.*, 2005). Segundo Alexander e Grierson (2002) e Wild e colaboradores (2005), são propostos dois sistemas para a regulação do etileno em plantas climatéricas: 1) funcional somente durante o crescimento vegetativo normal, sendo o etileno produzido em nível basal em todos os tecidos, mesmo em frutos não climatéricos, com a produção auto-inibitória; 2) funcional somente durante o amadurecimento e senescência, sendo a produção autocatalítica.

Segundo Jona e colaboradores (2002), a sensibilidade de plântulas ao etileno está relacionada as características climatéricas do fruto.

Para o maracujazeiro-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) tem se observado alta sensibilidade ao etileno afetando o desenvolvimento de ápices caulinares, rizogênese, segmentos nodais e regeneração *de novo* de ramos a partir de explantes de hipocótilo (Faria e Segura, 1997; Barbosa, 1999; Barbosa et al., 2001; Reis, 2001; Reis et al., 2003). Isso torna o controle da biossíntese e do acúmulo de etileno nos frascos de cultura imprescindíveis para o bom resultado dos protocolos de cultivo *in vitro* para essa espécie.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do efeito do etileno sobre a morfogênese *in vitro* em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*, por meio de suplementação do promotor (ACC), dos inibidores do etileno (AVG - aminoetoxivinilglicina e STS - tiosulfato de prata) e do seqüestrador (PM – perclorato de mercúrio), associado a um acompanhamento concomitante dos níveis endógenos de poliaminas.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos de hipocótilos (10 mm de comprimento) de plântulas de *Passiflora cincinnata* germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de indução de organogênese, conforme descrito no Capítulo 1. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco de vidro (60 x 60 mm, 125 ml de capacidade), contendo dez explantes cada.

Os inibidores de etileno utilizados foram aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (STS), e o promotor utilizado ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano (ACC). Como agente sequestrante de etileno utilizou-se perclorato de mercúrio (PM). As substâncias, à exceção do PM, foram filtro-esterilizadas em filtro Millex-GS (Millipore, USA) com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro, sendo, então, acrescentadas ao meio de cultura durante o resfriamento (aproximadamente 45°C), em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro do tipo “baby-food jars” (60 x 60 mm, 125 ml) previamente autoclavados. O STS foi preparado vertendo-se solução de tiosulfato de sódio sobre cristais de nitrato de prata a uma proporção molar final de 4:1 (tiosulfato:prata) (Reid *et al.*, 1980).

A solução de perclorato de mercúrio (250 mmol.L<sup>-1</sup>) foi introduzida ao sistema de cultivo por meio da fixação de um tubo Eppendorf de 1,5 ml, previamente autoclavado, ao meio de cultura, sendo o volume de PM utilizado de 500 µL.

A concentração de ACC e AVG utilizada foi de 3 µM e a de STS de 10 µM, com base nas concentrações testadas por Reis (2001). As interações entre o promotor (ACC) e as demais substâncias foram testadas, com a realização de tratamentos com acréscimo conjunto do ACC e cada uma das substâncias. Além destes tratamentos, um último tratamento consistiu da utilização do PM até o nono dia de subcultivo com sua posterior retirada.

Os tratamentos utilizados foram: 1) Controle (sem adição de qualquer substância); 2) ACC 3 µM; 3) AVG 3 µM; 4) STS 10 µM; 5) PM; 6) ACC 3 µM + AVG 3 µM; 7) ACC 3 µM + STS 10 M; 8) ACC 3 µM + PM; 9) ACC 3 µM + PM (sendo retirado ao 9º dia de subcultivo).

A quantificação de poliaminas e a mensuração de etileno ocorreram nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 30 dias de acordo com a metodologia anteriormente

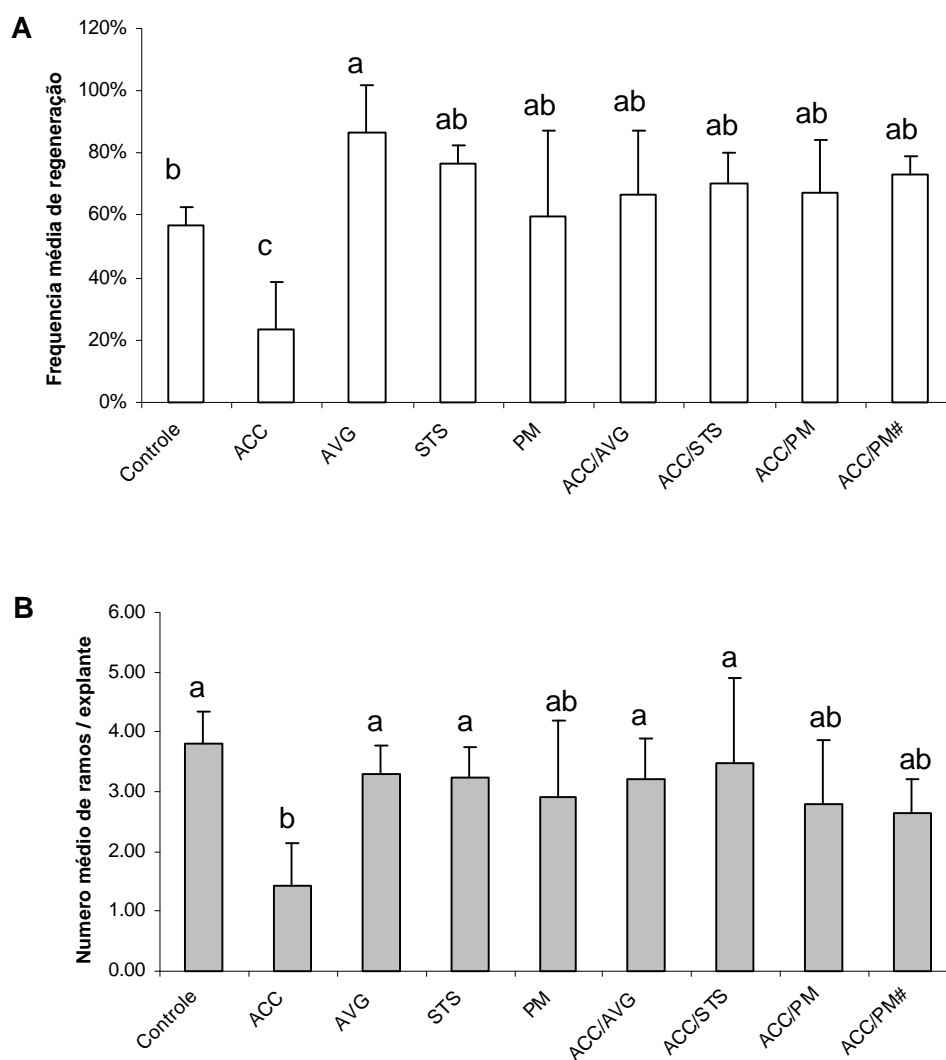
descrita (Capítulo 1), além da avaliação da capacidade morfogênica do material vegetal, quanto a frequência média de regeneração e número de ramos por explante (considerou-se apenas aqueles com comprimento maior que 2 mm, visualmente individualizados).

Os dados da resposta morfogênica foram submetidos a análise de variância e para a comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan a 5% de probabilidade, sendo o experimento montado em delineamento inteiramente casualizado, em que as repetições foram escolhidas por meio de sorteio. Os dados de etileno e poliaminas foram analisados a partir da média e seu respectivo desvio padrão.

### 3- RESULTADOS

A inibição da ação ou biossíntese de etileno promoveu incremento, apesar de não diferir estatisticamente, na frequência média de regeneração, tanto nos meios onde houve acréscimo das substâncias isoladamente como naqueles em que houve adição concomitante de ACC, observando que os inibidores foram eficazes na reversão dos efeitos do ACC, sendo que o tratamento com adição de AVG diferiu estatisticamente.

O tratamento com ACC diminuiu tanto a frequência de resposta como o número médio de ramos por explante, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos com relação a frequência média de regeneração.



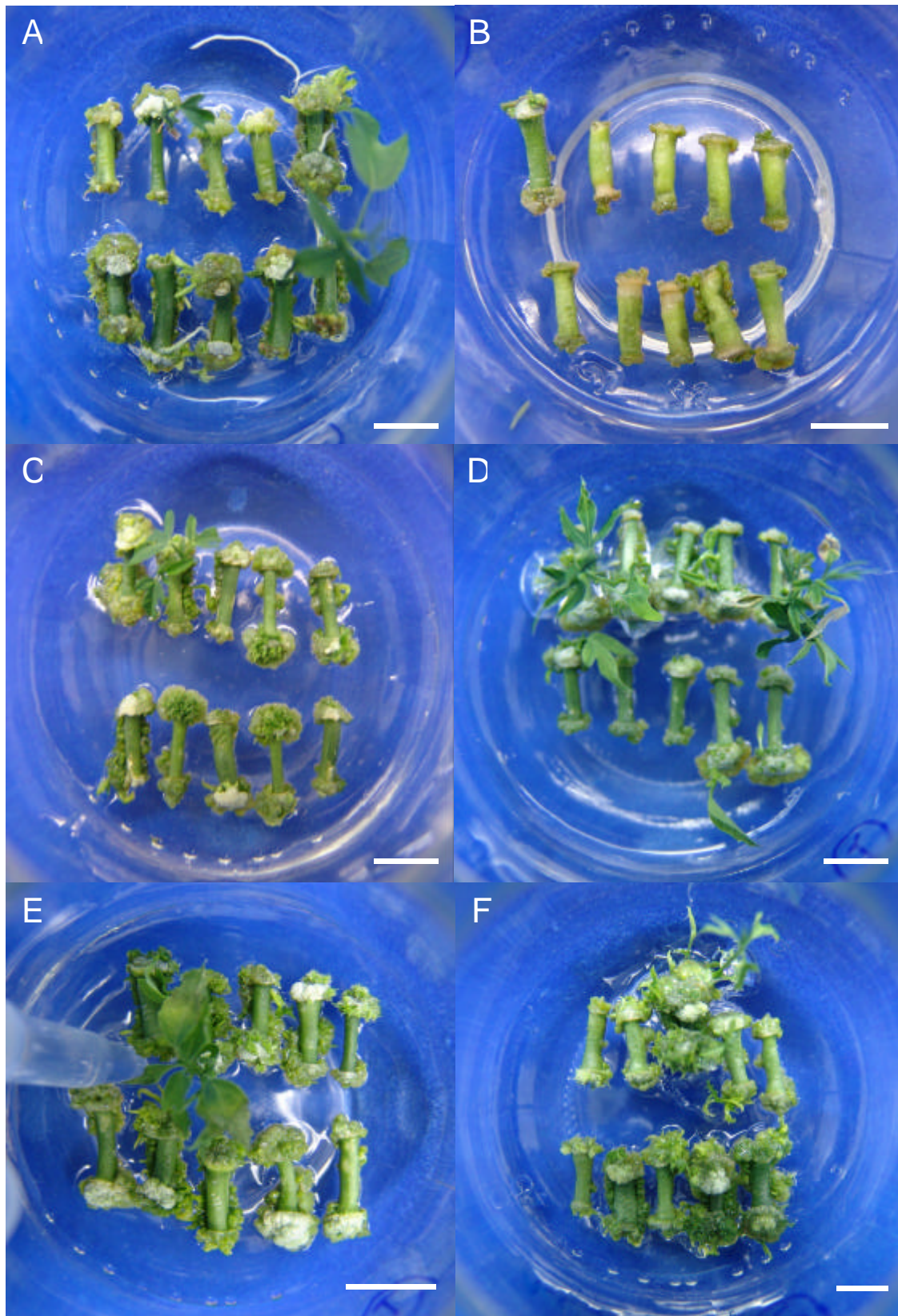
**Figura 1** – Respostas morfológicas de explantes de hipocótilo de *P. cinnamomum*. **A** - Frequência média de regeneração. **B** – Número médio de ramos formados por explante. As médias com mesma letra não diferem entre si estatisticamente segundo o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Nas extremidades dos explantes, com exceção do tratamento com ACC, verificou-se intensa diferenciação de primórdios foliares. Não ocorreram alterações do córtex e epiderme na região mediana do explante (Figura 2).

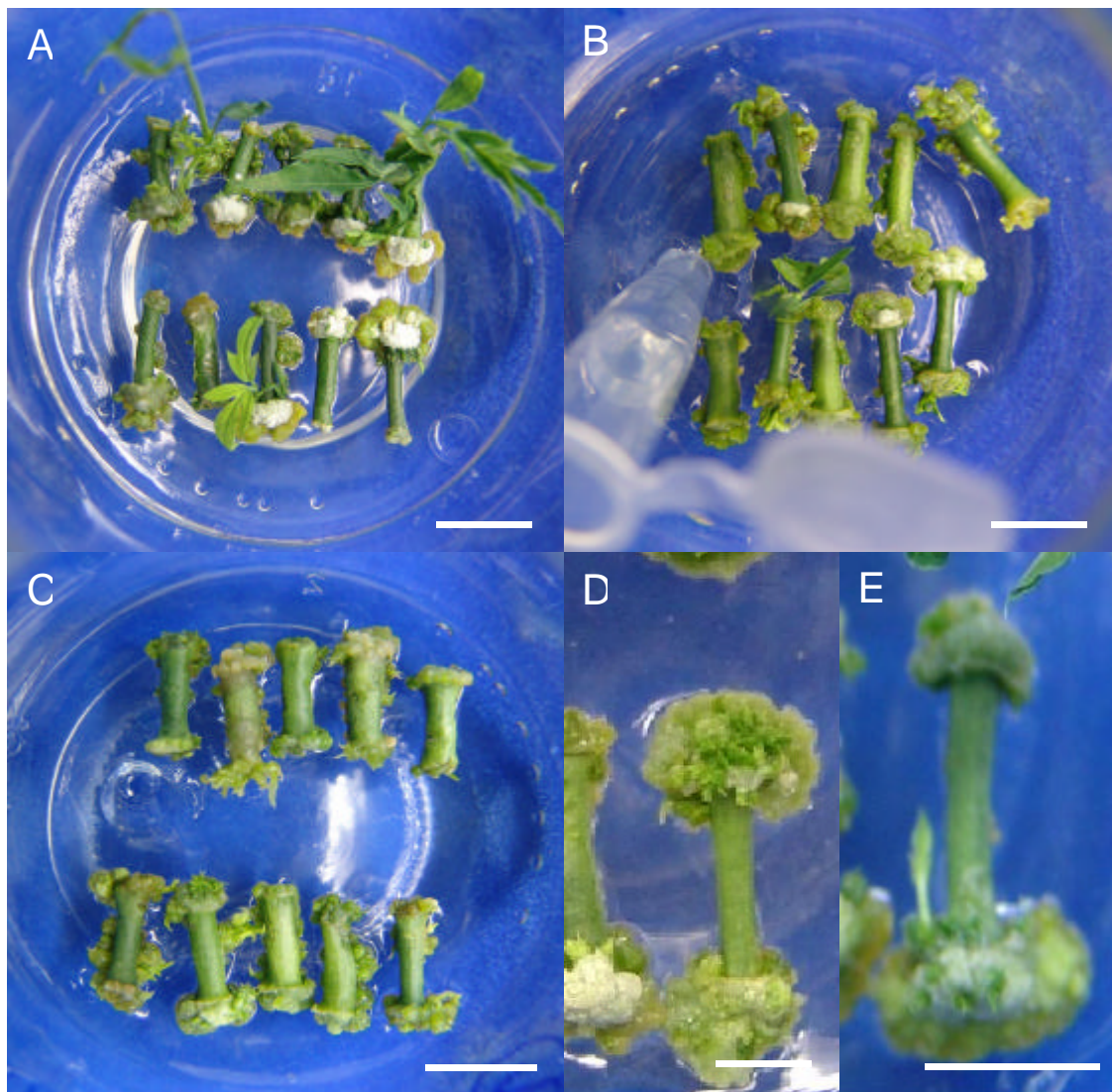
As gemas produzidas nos meios em que houve adição de AVG apresentam uma conformação de roseta, com alta formação de gemas agrupadas, ao passo que as gemas produzidas em meio com STS apresentam-se isoladas (Figura 3D e E).

No tratamento com ACC foi observado o entumescimento do explante com marcante expansão radial, tal como o observado por Reis (2001).

Não foi observada diferença temporal com relação à formação de gemas em nenhum dos tratamentos, sendo que a formação de gemas se deu por volta do nono dia.



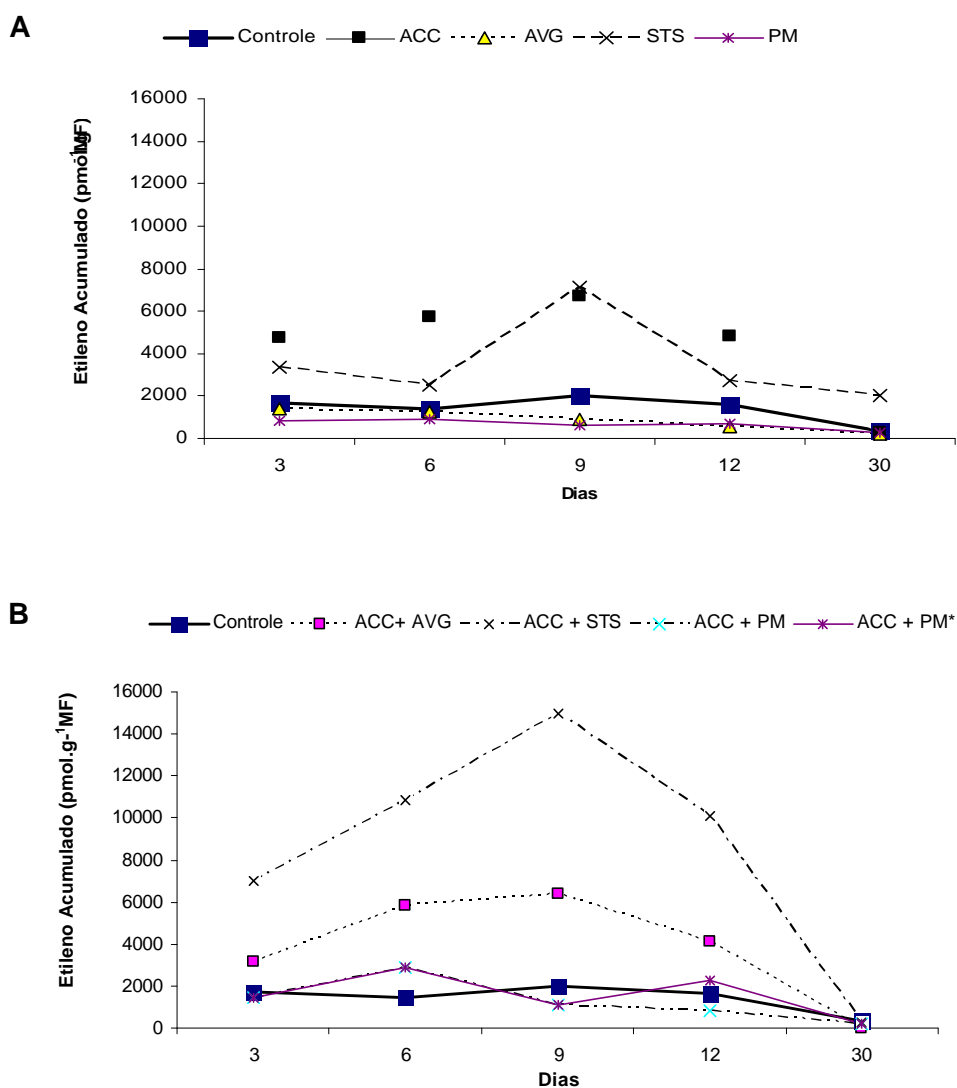
**Figura 2** Respostas morfológicas de explantes de hipocótilo de *P. cincinnata* cultivados em meio de regeneração: sem suplementação (A), com adição de ACC (B), AVG (C), STS (D), PM (E), ACC e AVG (F). As barras correspondem a 10mm.



**Figura 3**– Respostas morfológicas de explantes de hipocótilo de *P. cincinnata* em meio de regeneração: com suplementação de ACC e STS (**A**), ACC e PM (**B**), ACC e PM com a remoção do PM ao nono dia de cultura (**C**). Detalhe da resposta organogênica em meio com suplementação de AVG (**D**) e STS (**E**). Barras: A – C = 10mm; D – E = 5mm

Os níveis de acúmulo de etileno seguiram padrões distintos para cada substância utilizada (Figura 4). Os níveis de produção de etileno (dados não mostrados) seguiram padrão semelhante ao apresentado para o acúmulo de etileno.

Observa-se que o AVG foi eficiente em bloquear a síntese de etileno e o perclorato de mercúrio eficiente na captura do etileno produzido, sendo que os níveis de acúmulo foram consideravelmente inferiores. O tiosulfato de prata apresentou altas taxas de acúmulo de etileno, contudo, observa-se que o STS foi eficaz em impedir a ação do etileno, uma vez que as respostas morfológicas não diferiram do tratamento controle.



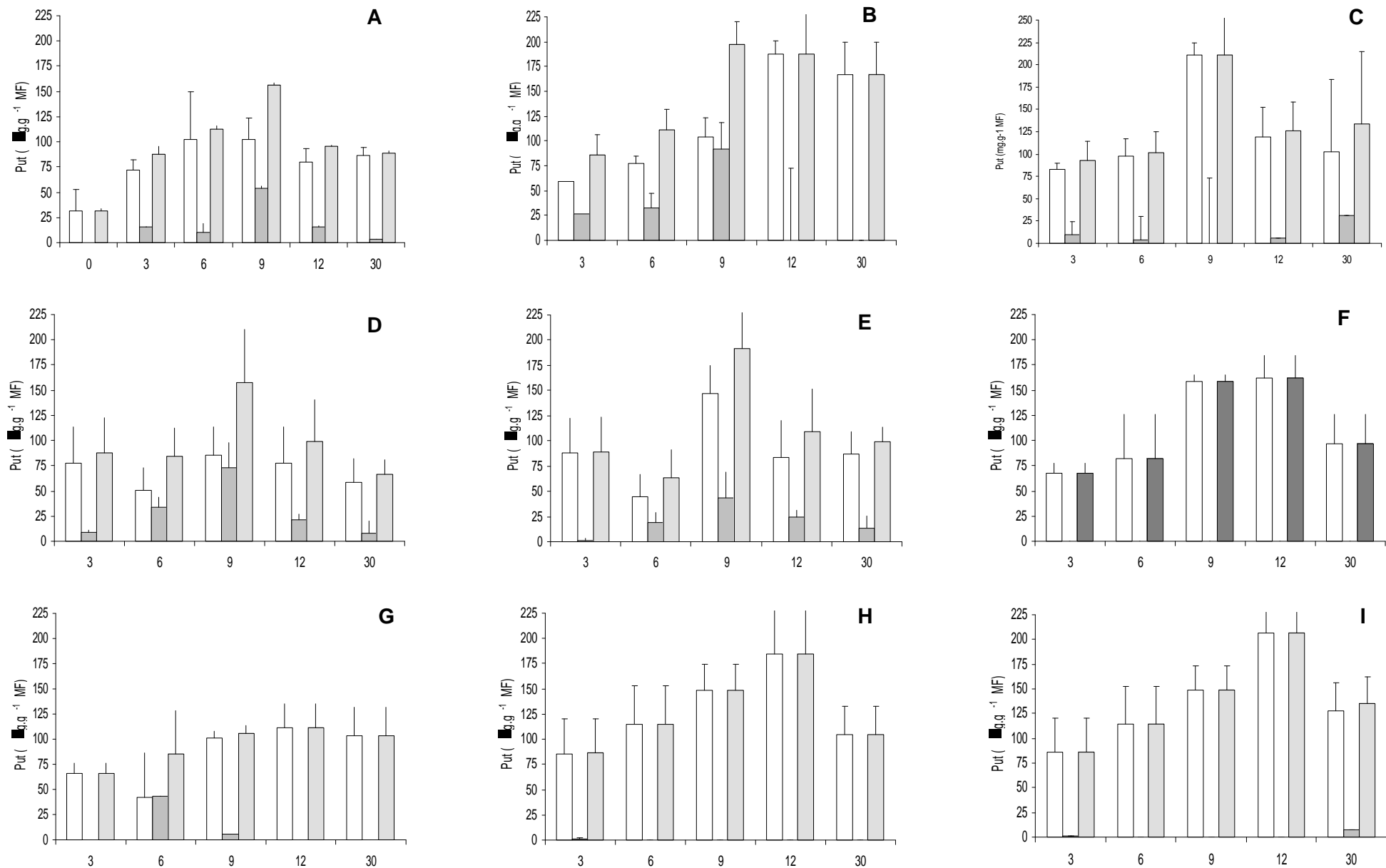
**Figura 4** – Níveis de acúmulo de etileno mensurado ao longo do período de indução de organogênese. **A** – Substâncias acrescidas ao meio individualmente. **B** – Interação entre ACC e demais substâncias.

Nos tratamentos em que houve adição concomitante de ACC e AVG, ACC e PM observou-se que estas substâncias foram eficientes na redução dos níveis de etileno quando comparados ao tratamento com adição isolada de ACC. No tratamento com adição de STS houve elevação dos níveis de etileno, entretanto não foi observada interferência na resposta morfogênica tal como na sua utilização individualizada.

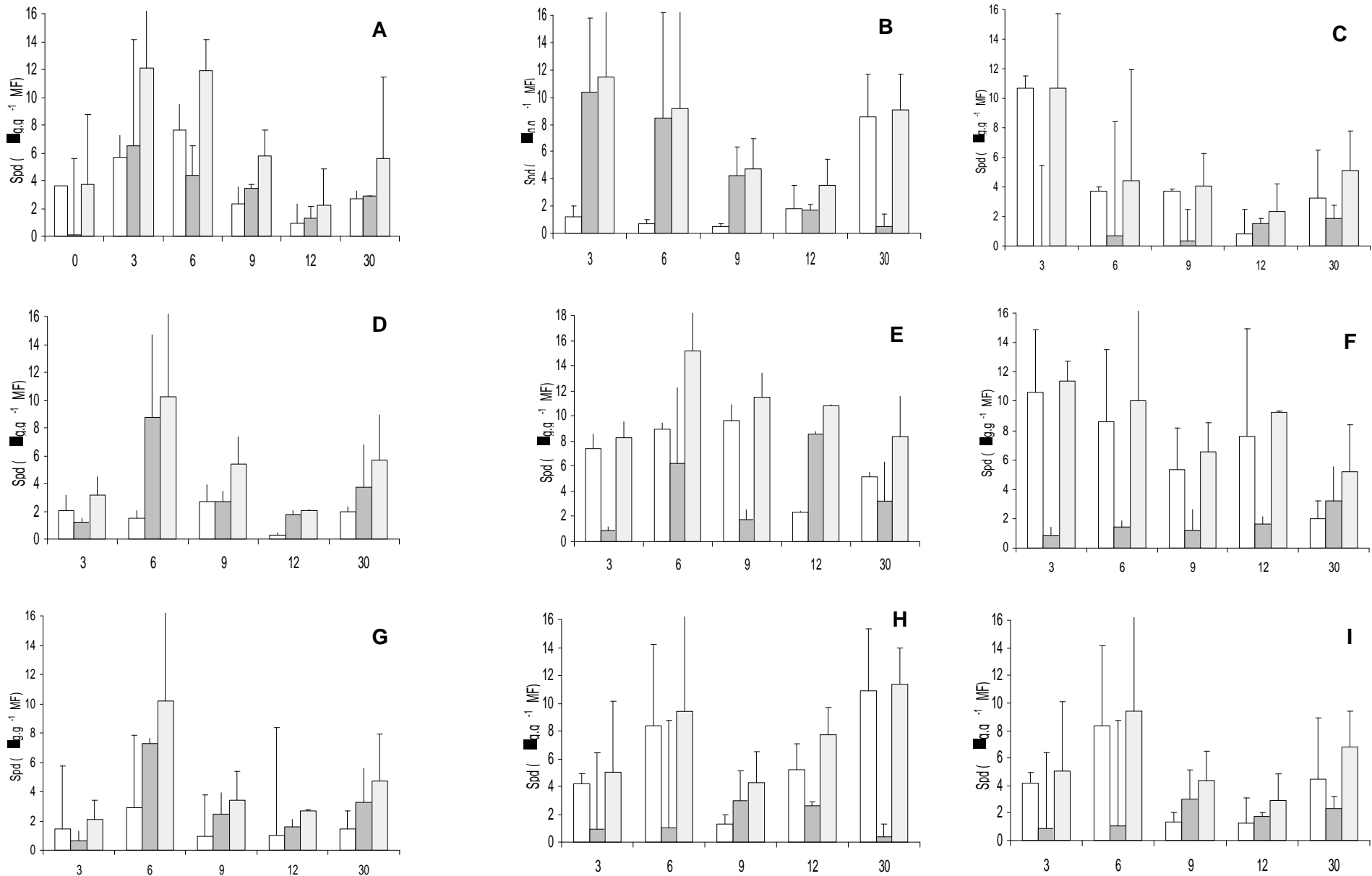
Os tratamentos com adição de ACC, STS e PM individualizados promoveram aumento no nível de conjugação de poliaminas, especialmente SPD e SPM (Figuras 5, 6 e 7). Em todos tratamentos foi observado um pico de putrescina por volta do nono ao 12º dia (Figura 5).

O tratamento com AVG, isoladamente ou associado ao ACC, promoveu incremento nos níveis de SPM e SPD, especialmente. Para o tratamento com adição de STS, observou-se uma redução dos níveis de SPD e SPM, associado à uma alta taxa de conjugação, sendo que, em alguns momentos, superior à forma livre (Figuras 6 e 7).

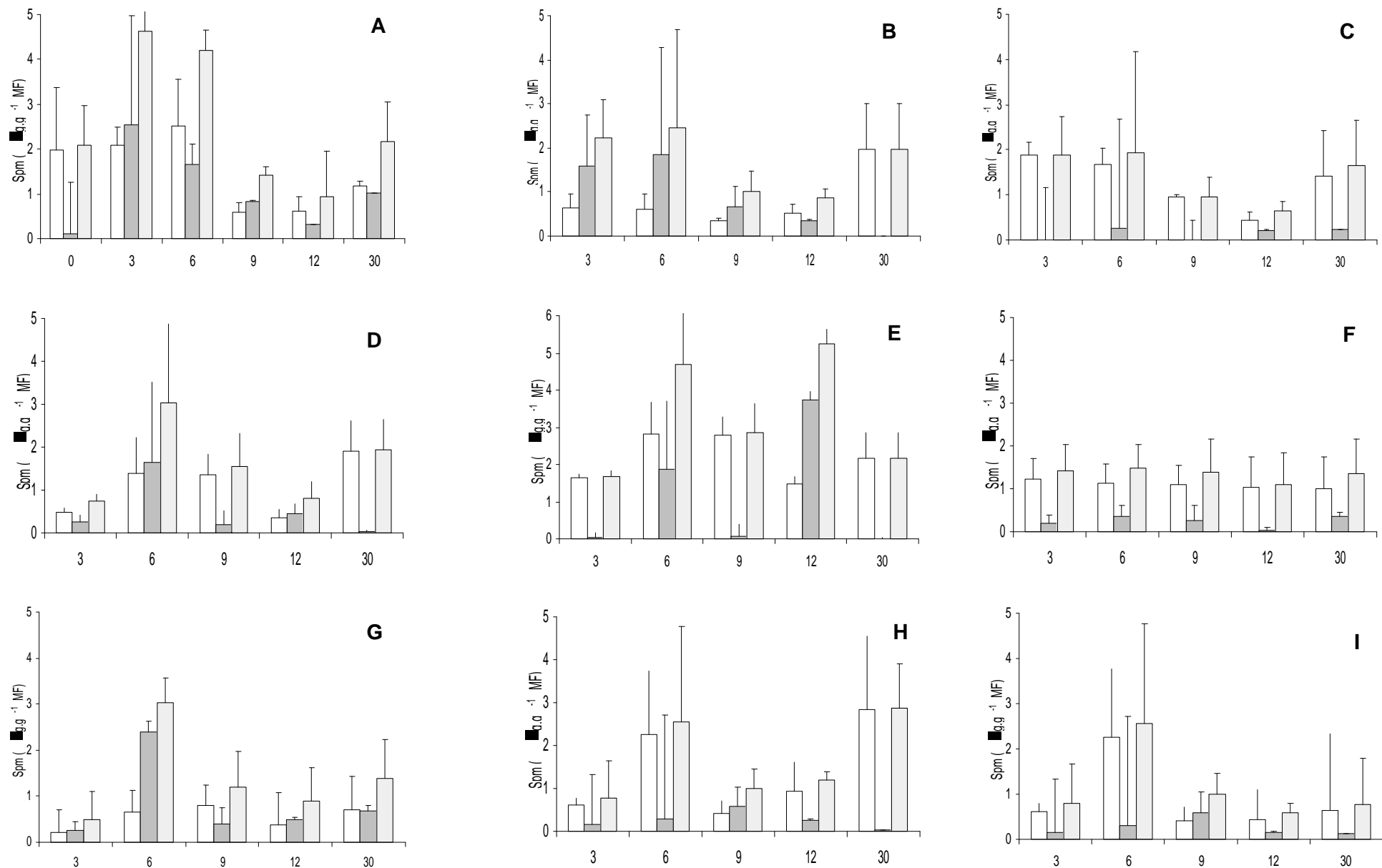
As maiores razões  $PUT/(SPD + SPM)$  foram observadas nos tratamentos com adição de ACC e AVG isoladamente, ocorrendo por volta do nono ao 12º dias. No tratamento com PM, verificou-se um incremento da razão  $PUT/(SPD + SPM)$  após a retirada do PM no nono dia de cultivo (Figura 9).



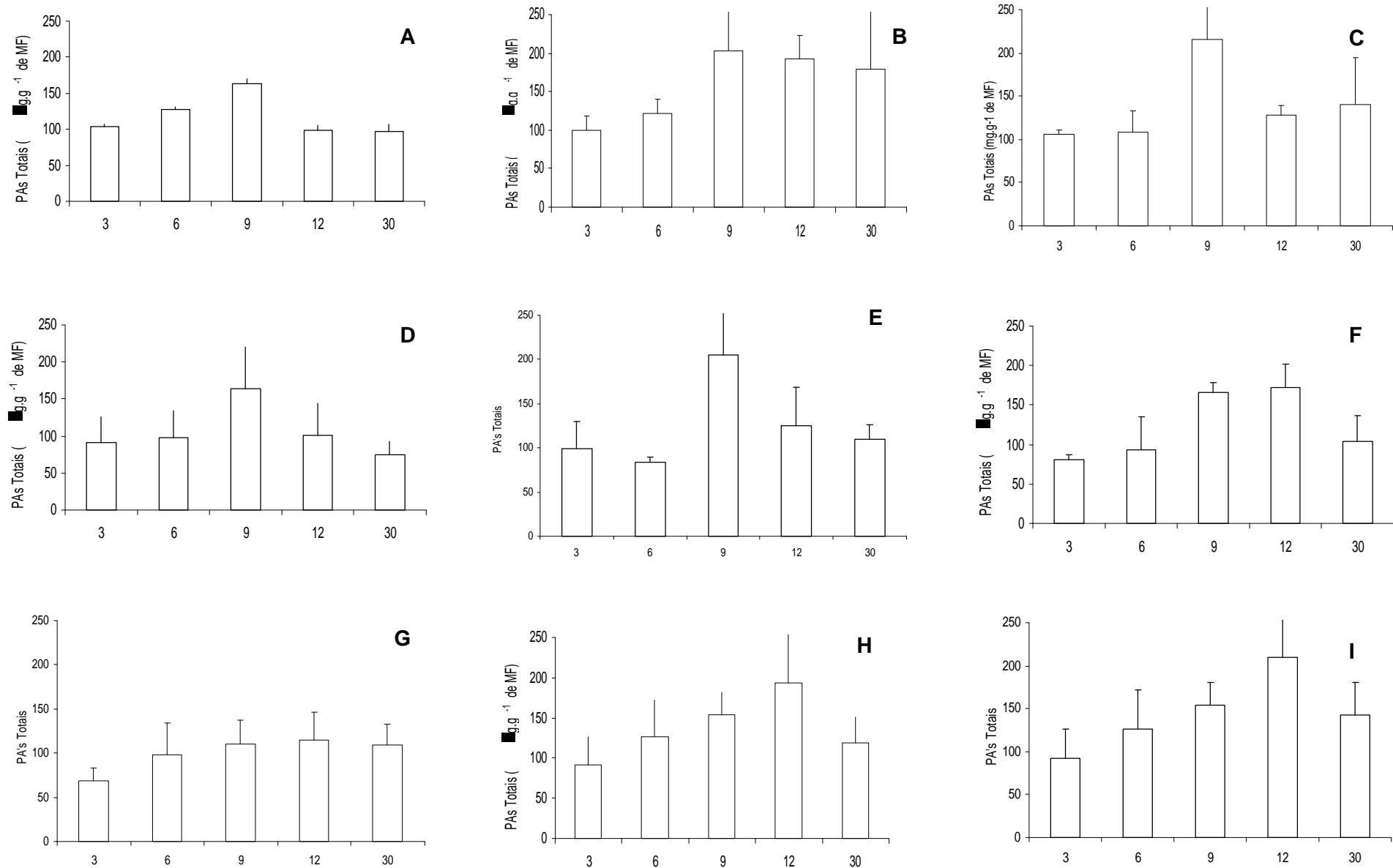
**Figura 5** – Níveis de putrescina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - ACC; **C** - AVG; **D** - STS; **E** - PM; **F** - ACC+AVG; **G** - ACC+STS; **H** - ACC+PM; **I** - ACC+PM retirado ao nono dia. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



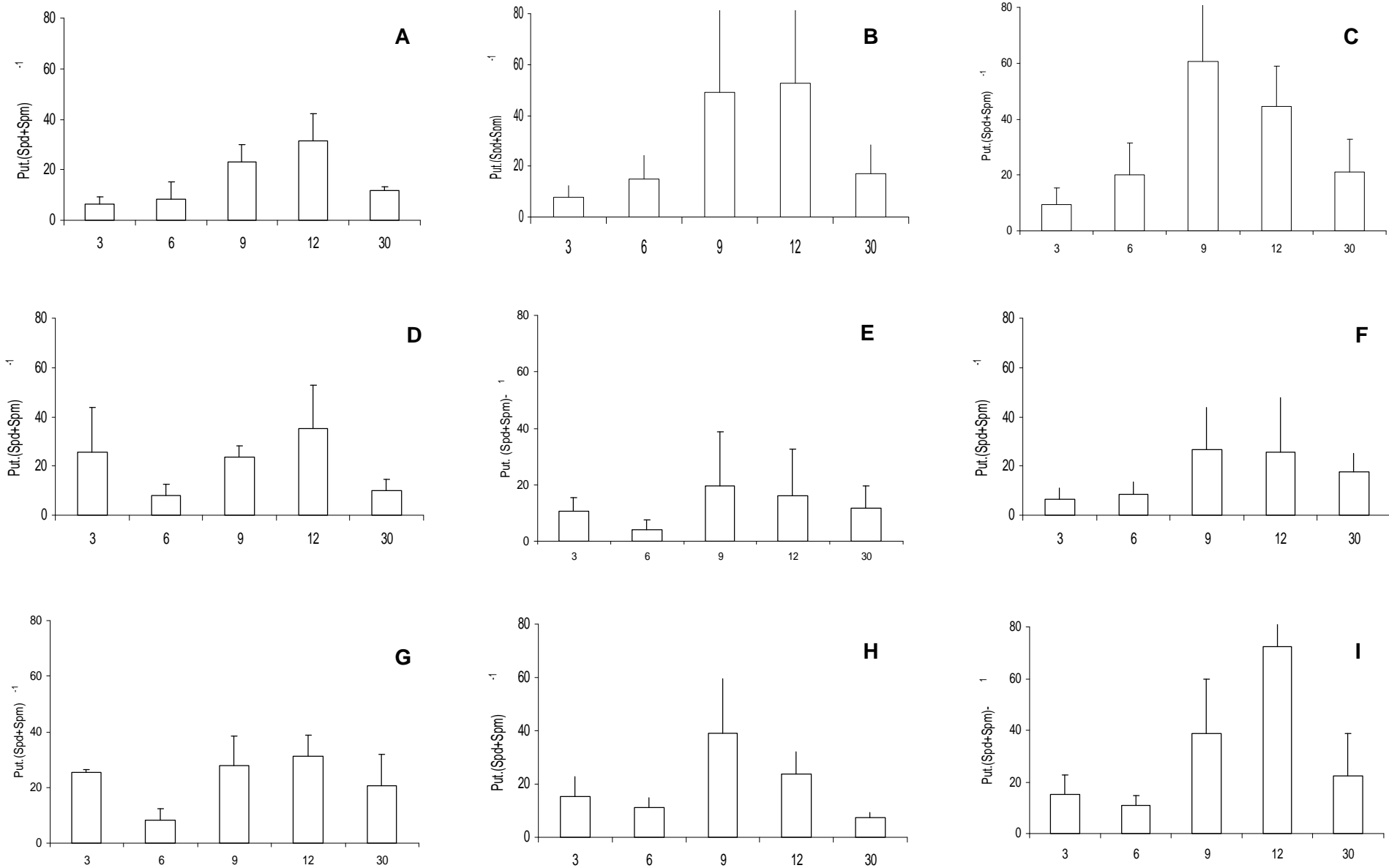
**Figura 6** - Níveis de espermidina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - ACC; **C** - AVG; **D** - STS; **E** - PM; **F** - ACC+AVG; **G** - ACC+STS; **H** - ACC+PM; **I** - ACC+PM retirado ao nono dia. □ Livres █ Conjugadas ▨ Totais



**Figura 7** – Concentrações de espermina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - ACC; **C** - AVG; **D** - STS; **E** - PM; **F** - ACC+AVG; **G** - ACC+STS; **H** - ACC+PM; **I** - ACC+PM retirado ao nono dia. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



**Figura 8** – Poliaminas totais ( $\mu\text{g. g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - ACC; **C** - AVG; **D** - STS; **E** - PM; **F** - ACC+AVG; **G** - ACC+STS; **H** - ACC+PM; **I** - ACC+PM retirado ao nono dia.



**Figura 9** – Razão PUT/(SPD + SPM) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - ACC; **C** - AVG; **D** - STS; **E** - PM; **F** - ACC+AVG; **G** - ACC+STS; **H** - ACC+PM; **I** - ACC+PM retirado ao nono dia.

#### 4- DISCUSSÃO

Os efeitos de etileno na cultura de tecidos têm se mostrado bastante contraditórios (Pua, 1999). Sabe-se que existe sempre uma concentração crítica sendo que o controle do fitohormônio não se dá somente pela concentração mas também pela alteração na sensibilidade das células-alvo (Gaspar *et al.*, 2003).

A rota biossintética do etileno é bastante conhecida sendo que diversos estudos em cultura de tecidos têm trabalhado com inibidores e promotores de forma a caracterizar o seu papel nas respostas morfogênicas (Cameron *et al.*, 1979; Kato *et al.*, 1987, Kumar *et al.*, 1987; Chi *et al.*, 1991; Adkins *et al.*, 1993; Sarkar *et al.*, 2002; Naik e Chand, 2003, Reis *et al.*, 2003, Koehler, 2004).

No presente estudo verificou-se que as substâncias que atuam na biossíntese, ação ou seqüestradores de etileno não comprometeram a resposta organogênica, sendo que a suplementação com AVG permitiu níveis de acúmulo de etileno. A adição de AVG permitiu níveis de acúmulo de etileno sem que houvesse comprometimento da morfogênese, tal como observado no tratamento com perclorato de mercúrio.

Koehler (2004) em seus estudos com embriogênese somática em *Carica papaya* observou que a adição de AVG na menor concentração testada (3  $\mu\text{M}$ ) não afetou o processo de indução de embriogênese, mas inibiu a diferenciação dos embriões somáticos. Entretanto Magdalita e colaboradores (1997), trabalhando com segmentos nodais, observaram que a adição de 1,2  $\mu\text{M}$  de AVG melhorou significativamente o desempenho da cultura.

Inibidores da biossíntese de etileno, tal como AVG, suprimiram a diferenciação *in vitro* de elementos traqueais em *Zinnia elegans*, sugerindo o envolvimento do etileno na indução ou progressão da diferenciação (Fukuda, 1996), sendo o mesmo observado por Biondi e colaboradores (1998) onde precursores ou compostos que liberam o etileno aumentaram a xilogênese enquanto inibidores do etileno retardaram o processo.

Tem-se conhecimento de que em concentrações acima de 0,1  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , o etileno altera o padrão de crescimento de plântulas pela redução da taxa de alongamento e aumento da expansão lateral, por meio da reorientação dos

microtúbulos (Taiz e Zeiger, 2004), podendo-se supor que níveis acima dos ideais podem ser o fator responsável pela recalcitrância de várias culturas *in vitro* (Magdalita *et al.*, 1997).

A adição de STS, apesar de promover o incremento do acúmulo, mostrou-se eficiente inibindo a ação do etileno sem que houvesse reflexos na resposta organogênica. A supressão da atividade do etileno pela prata mostrou-se evidente em cultura *in vitro* de batata sendo que no sistema selado com adição de prata houve incremento de cinco vezes na área foliar, seis vezes na massa fresca de folhas e incremento significativo no tamanho das raízes (Zobayed *et al.*, 2001). Bais e colaboradores (2001) observaram que nitrato de prata estimulou a produção de etileno pela interferência do íon prata no receptor do etileno promovendo um *feedback* positivo.

Biondi e colaboradores (1998) trabalhando com camadas subepidérmicas de tabaco observaram que com o bloqueio da ação do etileno, promovido pela ação do STS, o crescimento organizado foi inibido, mas o crescimento proliferativo indiferenciado não.

No tratamento com ACC observou-se incremento dos níveis de etileno associados à diminuição da resposta morfogênica. Nos tratamentos com adição concomitante de ACC e AVG observou-se níveis elevados de etileno, contudo inferiores ao tratamento com ACC isoladamente, sem comprometimento da organogênese. Pode-se supor que no tratamento com ACC os níveis foram supra-ótimos levando à inibição ou, ainda, que a sensibilidade dos receptores pode ter sido alterada.

Huxter e colaboradores (1981) constataram que as repostas ao etileno ocorrem de maneira diversa nos tecidos dependendo do período de cultivo. No início da cultura de calo de tabaco (primeiros cinco dias) o etileno derivado da aplicação de ACC e Ethephon inibiu a organogênese, enquanto que do 5º ao 10º dia o etileno endógeno favoreceu a formação de gemas. O mesmo foi observado por Biondi e colaboradores (1998) em cultivo de camadas finas de células subepidérmicas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun, onde a adição de AVG nos primeiros dias de cultivo acelerou a formação de meristemóides, mas inibiu a resposta organogênica mais tardiamente.

Em cultura de segmentos de hipocótilo de *Brassica oleracea* a adição de AVG (2.5, 5.0, 10, e 20 µM) não afetou significativamente as repostas

organogênicas comparativamente ao tratamento controle, ao passo que a adição de ACC (20, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) comprometeu drasticamente tais respostas regenerativas (Cheng *et al.*, 2001).

Verifica-se que a relação competitiva entre etileno e poliaminas é variável de acordo com a etapa da cultura. Para o meio com adição de ACC, o qual se esperava um aumento da biossíntese de poliaminas por maior disponibilidade de substrato para a biossíntese de etileno, não foi observado incremento nos níveis de SPD e SPM. Para o tratamento com adição de STS, onde se observa alto acúmulo de etileno, observa-se uma redução dos níveis de SPD e SPM, associado a uma alta taxa de conjugação sendo em alguns momentos superior a forma livre. No tratamento onde houve remoção do PM ao nono dia verificou-se aumento da produção de etileno acompanhado de redução nos níveis de SPD e SPM. O tratamento com ácido aminooxiacético (AOA) ou com AVG não promoveu a síntese de SPD e SPM em discos foliares de *Brassica napus* (Aziz *et al.*, 1990).

Chi e colaboradores (1991) trabalhando com couve chinesa observaram que a adição de inibidores de etileno não afetou o nível endógeno de poliaminas. Similarmente, os níveis de produção de etileno, atividade da sintase do ACC e ACC do explante não são afetados pela aplicação de poliaminas, sugerindo que o efeito promotor das poliaminas sobre a regeneração não está ligado à inibição da síntese de etileno.

Segundo Torrigiani e colaboradores (1987) o balanço entre as formas livres e conjugadas pode ser crítica para os diferentes processos de desenvolvimento, sendo que Scaramagli e colaboradores (1999) sugerem que quando os níveis de poliaminas conjugadas estão elevados, há comprometimento da organogênese. Por outro lado, Li e Burrit (2003) sugerem que a relação entre as formas livres, conjugadas e ligadas, aparentemente, não apresenta relação com a capacidade embriogênica. No presente estudo não foi observada correlação entre a taxa de conjugação e a resposta morfogênica.

Uma interação entre poliaminas e etileno a ser explorada está na capacidade das poliaminas em capturar radicais livres, sendo que durante a biossíntese do etileno na ação da oxidase do ACC é requerido um radical superóxido (George, 1993; Li *et al.*, 2004). Em plantas de *Glycyrrhiza inflata* submetidas a condições de estresse, Li e colaboradores (2004) observaram

que o etileno promoveu a atividade das diaminas oxidases (DAO) e poliaminas oxidases (PAO), sendo que etileno e as espécies reativas de oxigênio (ROS) apresentaram um *feedback* positivo de produção. Dessa forma, reduzindo-se os níveis de ROS, as poliaminas inibem a produção de etileno (Papadakis e Roubelakis-Angelakis, 2005)

Neste trabalho foi possível observar o já proposto na literatura com relação à exigência de concentrações críticas e regulação temporal dos níveis de etileno para as respostas morfogênicas. A regulação temporal também aparenta ser peça chave para a competição entre as duas rotas biossintética, sem comprometimento da resposta morfogênica.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S.W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S.J.; ADKINS, A. (1993). Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, **44**: 1829-1835.
- ALEXANDER, L. GRIERSON, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, **53(377)**: 2039-2055.
- ALONSO, J. M.; ECKER, J. (2001). The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Science's STKE**, **70**: 1-10
- ARIGITA, L., MAJADA, J.P., GONZALEZ, A., SANCHEZ-TAMES, R. (2005). Controle Ambiental en cultivo *in vitro*: CO<sub>2</sub> y etileno. In: SANCHEZ-OLATE, M.E., LEAL, D.G.R. (eds.). Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Universidad de Concepcion, Concepcion-Chile. pp. 105-117.
- AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY, J.; LARHER, F. (1997). Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. **Plant Growth Regulation**, **21**: 153–163.
- BAIS, H. P.; SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. (2001). Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerants. **Plant Cell Reports**, **20**: 547–555.
- BARBOSA, W.M. (1999). **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV. 70p.
- BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELLOSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. (2001). Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, **7**: 47-51.
- BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P. (1998). Ethylene involvement in the vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, **202**: 134-144.
- CAMERON, A.C.; FENTON, C.A.L.; YU, Y.; ADAMS, D.O.; YANG, S.F. (1979). Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **HortScience**, **14**: 178-180.
- CARVALHO, M.H.C.; LE, B.V.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, A.T.P.; VAN, K.T.T. (2000). Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. **Plant Science**, **159**: 223-232.
- CHEN, Y. F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G.E. (2005). Ethylene signal transduction. **Annals of Botany**, **95**: 901–915.
- CHENG, P.-K.; LAKSHMANAN, P.; SWARUP, S. (2001). High frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid cycling *Brassica oleracea in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **37**: 592-598.

- CHI, G.L.; PUA, E.C.; GOH, C.J. (1991). Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. **Plant Physiology**, **96**: 178-183.
- CHI, G.L.; LIN, W.S.; LEE, J.E.; PUA, E.C. (1990). Role of polyamines on *de novo* shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. **Plant Cell Reports**, **13**: 323-329.
- EL MESKAOUI, A.; TREMBLAY, F.M. (2001). Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. **Journal of Experimental Botany**, **52**: 761-769.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. (1997). *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **33**: 209-212.
- FUKUDA, H. (1996). Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **47**: 299-325.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CRÊVECOELR, M.; PENNEL, G.L.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. (2003). Changing concepts in plant hormone action. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, **39**: 85-106.
- GEORGE, E.F. (1993). Plant Propagation by tissue culture. Part 1: The technology. 2 ed. Edington, Exegetics Limited, 574p.
- HATANAKA, T.; SAWABEB, E.; AZUMA, T.; UCHIDAB, N.; YASUDAB, T. (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science** **107**: 199-204.
- HUXTER, T.J.; THORPE, T.A.; REID, D.M. (1981). Shoot initiation in light and dark grown tobacco callus: the role of ethylene. **Physiologia Plantarum**, **53**: 319-326.
- JONA, R.; CATTRO, A.; TRAVAGLIO, D. (2002). The climacteric feature of fruits is reflected in the sensitivity to ethylene of plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, **94**: 273–284.
- KATHO, Y.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T.; FUJII, T. (1987). Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and ethylene production in hiproly barley callus during differentiation. **Agricultural Biological Chemistry**, **51**: 2185-2190.
- KOEHLER, A.D. (2004). **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV. 72p.
- KUMAR, P.P.; REID, D.M.; THORPE, T.A. (1987). The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata* *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, **69**: 244-252.
- LI, Z.; BURRIT, D.J. (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. **Plant Growth Regulation**, **40**: 65-74.

- LI, C.; JIAO, J.; WANG, G. (2004). The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. **Plant Science**, **166**: 303-315.
- MA, J.H.; YAO, J.L.; COHEN, D.; MORRIS, B. (1998). Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. **Plant Cell Reports**, **17**: 211-214.
- MAGDALITA, P.M.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W. (1997). Effects of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **49**: 93-100.
- NAIK, S.K.; CHAND, P.K. (2003). Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Journal of Plant Physiology**, **160**: 423-430.
- OGAWARA, T.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; EZURA, H. (2003). Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, **160**: 1335–1340.
- OZODOGRU, E. A.; OZDEN-TOKATLI, Y.; AKCIN, A. (2005). Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **41**:151-156.
- PAIVA NETO, V.B. (2002). **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV. 127p.
- PASCHALIDIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant: correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. **Plant Physiology**, **138**: 2174-2184.
- PUA, E.-C. (1999). Morphogenesis in cell and tissue cultures: role of ethylene and polyamines. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Eds.) Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp.255-303.
- REID, M.S., PAUL, J.L., FARHOOMAND, M.B., KOFRANEK, A.M., STABY, G.L. (1980). Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **Journal of American Society of Horticultural Science**, **105**: 25-27.
- REIS, L.B. (2001). **Morfogênese in vitro de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV. 90p.
- REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÉGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. (2003). Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **39**: 618-622.
- SARKAR, D.; SUD, K.C.; CHAKRABARTI, S.K.; NAIK, P.S. (2002). Growing of potato microplants in the presence of alginate-silverthiosulfate capsules reduces ethylene-induced culture abnormalities during minimal growth conservation *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **68**: 79-89.

- SCARAMAGLI, S.; BIONDI, S.; CAPITANI, F.; GEROLA, P.; ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P. (1999). Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Physiologia Plantarum**, **105**: 367-376.
- SCHALLER, G.E.; KIEBER, J.J. (2002). Ethylene. The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists. Rockville (MD).17p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). Fisiologia Vegetal. 3 Ed. Artmed. Porto Alegre/RS: pp. 541-558.
- TORRIGIANI, P.; ALTAMURA, M.M.; PASQUA, G.; MONACELLI, B.; SERAFINII-FRACASSINI, D.; BAGNI, N. (1987). Free and conjugated polyamines during *de novo* floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. **Physiologia Plantarum**, **70**: 453-460.
- WILD, H.P.J.; BALCK, P.A.; FERNANDES, E.C.A; PEPPELENBOS, H.W. (2005). The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, **36**: 273–280.
- ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. (2001). Micropropagation of potato: Evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. **Annals of Botany**, **87**: 53-59.

### **Influência de poliaminas e de seu inibidor sobre a capacidade organogênica e os níveis endógenos de poliaminas e etileno em explantes de hipocótilo de *P. cincinnata* Masters**

#### **1- INTRODUÇÃO**

As poliaminas são policátions de baixo peso molecular, encontradas em todos seres vivos. Em plantas, estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento, além de respostas a estresses. As poliaminas também participam de diversas respostas fisiológicas, dentre estas: divisão celular, iniciação radicular, desenvolvimento floral, amadurecimento de frutos, embriogênese, regulação da replicação do DNA, transcrição de genes e senescência foliar (Kumar *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2000). As poliaminas são também consideradas como reservas de carbono e nitrogênio pelo menos para tecidos *in vitro* (Kakkar e Sawhney, 2002).

As poliaminas mais freqüentemente encontradas em plantas são a diamina putrescina (PUT), a triamina espermidina (SPD) e a tetramina espermina (SPM). Elas podem ocorrer de forma livre ou conjugada, em grande parte, com ácidos fenólicos como o ácido cinâmico, ferúlico ou caféico. Os níveis de poliaminas são altamente regulados pelas alterações no seu metabolismo (biossíntese, catabolismo e conjugação) (Martin-Tanguy, 2001).

A biossíntese de putrescina se dá pela descarboxilação da ornitina ou da arginina. O catabolismo da putrescina ocorre pela atividade da oxidase da diamina (DAO), e a de poliaminas pela ação de oxidases das poliaminas (PAO). A atividade da DAO é especialmente alta em leguminosas, ao passo que a atividade das PAOs é relativamente elevada em cereais. Sugere-se que, como a PAO é também encontrada na parede celular, talvez esteja envolvida no processo de lignificação, uma vez que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é necessária para a conversão peroxidativa de precursores de lignina (Galston e Kaur-Sawhney, 1995).

A conjugação de poliaminas atua regulando a interação com cátions inorgânicos como Ca<sup>2+</sup>, tendo implicações sobre a atividade das mesmas na estabilidade das membranas. Conjugados neutros não podem interagir ionicamente com fosfatos ou outros grupos aniônicos como proteínas, ácidos

nucléicos ou fosfolipídios. Reações de conjugação podem regular as funções de poliaminas, afetando, por exemplo, a ligação e co-ação com ácidos nucléicos (Martin-Tanguy, 2001). A conjugação com ácido cinâmico é de grande importância por regular os níveis de poliaminas livres e atuar na desintoxicação de compostos fenólicos que poderiam inibir o crescimento. Além disso, conjugados de poliaminas são um bom substrato para as peroxidases em células de folhas de tabaco (Negrel e Lherminier, 1987). As peroxidases utilizam os conjugados de poliaminas para remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do apoplasto, confirmando o papel protetor das poliaminas.

As concentrações e biossíntese de poliaminas seguem um padrão de decréscimo basípeto ao longo do eixo de plantas de tabaco, e possuem uma correlação negativa com o tamanho da célula, sendo o meristema apical caulinar o maior sítio de biossíntese de SPD e SPM, ao passo que tecidos hipógenos sintetizam mais PUT (Paschalidis e Roubelakis-Angelakis, 2005).

O envolvimento de poliaminas nas respostas morfogênicas *in vitro* tem sido abordado por vários autores em diferentes espécies (Lin *et al.*, 1984; Desai e Metha, 1985; Tiburcio *et al.*, 1989; Manoharan e Gnanam, 1992; Mengoli e Bagni, 1992; Galston e Kaur-Sawhney, 1995; Minocha e Minocha, 1996; Maatar e Hunault, 1997; Yadav e Rajam, 1997; Scoccianti *et al.*, 2000; Shoeb *et al.*, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2004; Petri *et al.*, 2005).

Muito se tem correlacionado as poliaminas com o ciclo celular, estando intimamente relacionadas a divisão e expansão celular com as diferentes poliaminas. Altas e baixas taxas de biossíntese de SPD são correlacionadas com divisão e expansão celular, respectivamente (Paschalidis e Roubelakis-Angelakis, 2005).

Kuznetsov e colaboradores (2002) propõem que as poliaminas podem ser classificadas em duas categorias baseadas no seu efeito biológico: o primeiro grupo compreendendo putrescina e cadaverina, que apresentam como respostas o estímulo ao alongamento celular e formação de raízes, e o segundo grupo, incluindo espermidina e espermina, envolvidas na divisão celular, organogênese e senescência.

Segundo Shoeb e colaboradores (2001), a regulação precisa dos níveis celulares de poliaminas é requerida durante os estádios críticos do desenvolvimento de plantas.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito das poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* em explantes de hipocótilo *Passiflora cincinnata*, por meio de suplementação com putrescina, espermidina e espermina, além do inibidor (MGBG), com acompanhamento concomitante dos níveis de etileno acumulado e poliaminas.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos de hipocótilos (10 mm de comprimento) de plântulas de *Passiflora cincinnata* germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de indução de organogênese, conforme descrito no Capítulo 1. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por um frasco de vidro do tipo “baby-food jars” (60 x 60 mm, 125 ml de capacidade), contendo dez explantes cada.

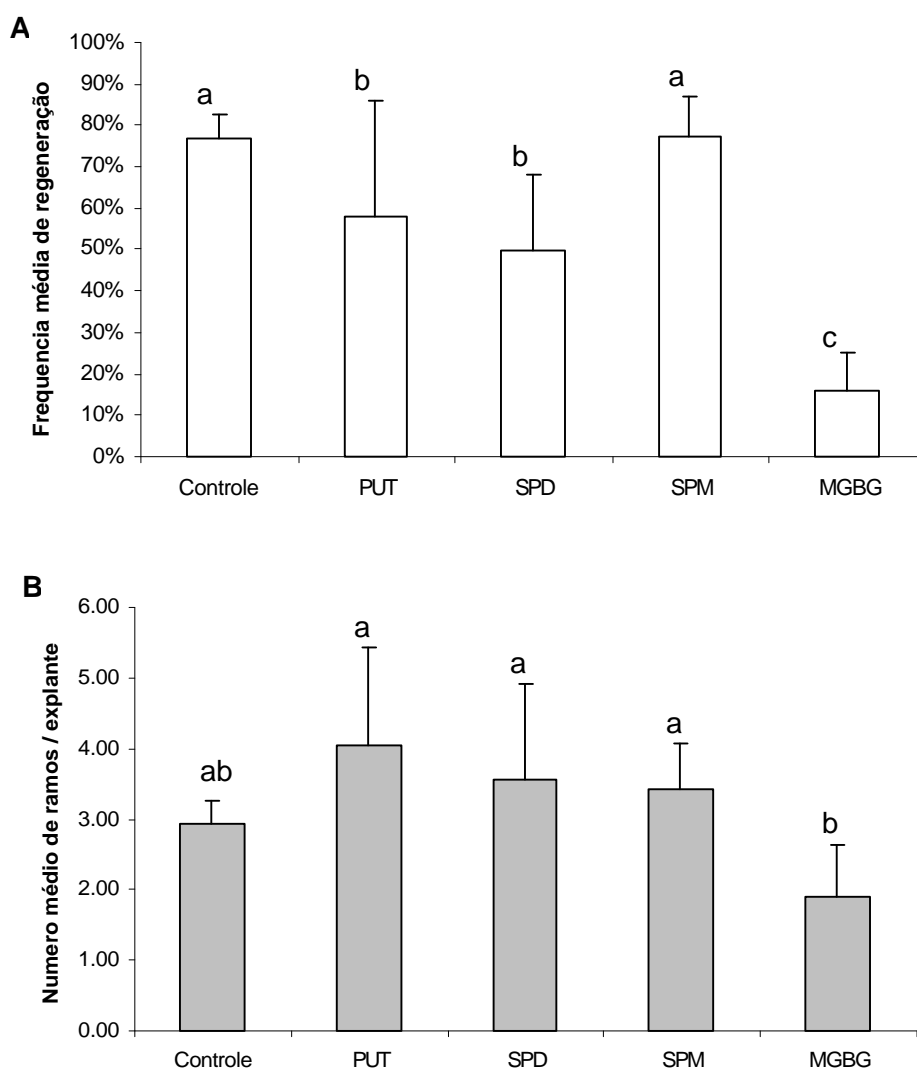
Foram incorporados ao meio de cultura as poliaminas: putrescina, espermidina e espermina, além do inibidor metilglioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG) (Sigma Chemical Company, USA). Todas as soluções das substâncias tiveram o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e foram filtro-esterilizadas em filtro Millex-GS (Millipore, USA) com membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  de diâmetro de poro, sendo acrescidas ao meio de cultura durante o resfriamento, em câmara de fluxo laminar. A adição das poliaminas e inibidor, na concentração de 1mM, foi realizada de forma individualizada de maneira a permitir uma melhor caracterização dos seus possíveis efeitos.

A quantificação de poliaminas e a mensuração de etileno ocorreram nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 30 dias de cultivo de acordo com a metodologia anteriormente citada, além da avaliação da capacidade morfogênica do material vegetal, quanto a frequência média de regeneração e número de ramos por explante (considerou-se aqueles com comprimento maior que 2 mm, visualmente individualizados).

Os dados referentes as respostas morfogênicas foram submetidos a análise de variância e para a comparação das médias foi realizado o teste de Duncan, a 5% de probabilidade, sendo o experimento montado em delineamento inteiramente casualizado, em que as repetições foram escolhidas por meio de sorteio. Os dados referentes a etileno e poliaminas foram analisados a partir da média e seu respectivo desvio padrão.

### 3- RESULTADOS

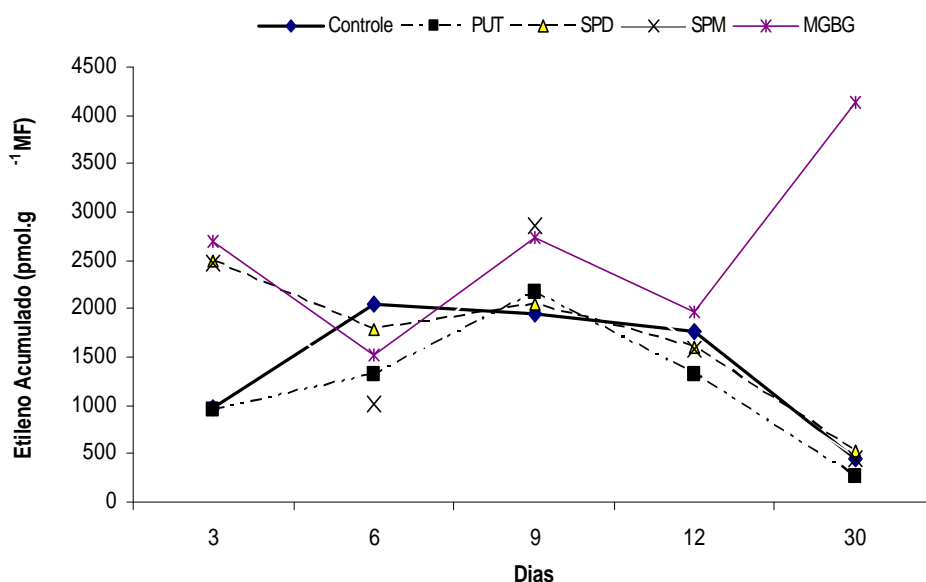
Os explantes submetidos ao tratamento com MGBG apresentaram características morfológicas semelhantes aos do tratamento com ACC observando-se o entumescimento do explante (Figura 3F). As respostas morfogênicas nos meio de cultivo com a adição de diferentes poliaminas foram semelhantes ao tratamento controle. Para o número médio de ramos por explante, observou-se um aumento nos tratamentos com adição de poliaminas, contudo, não foi observada diferença estatística.



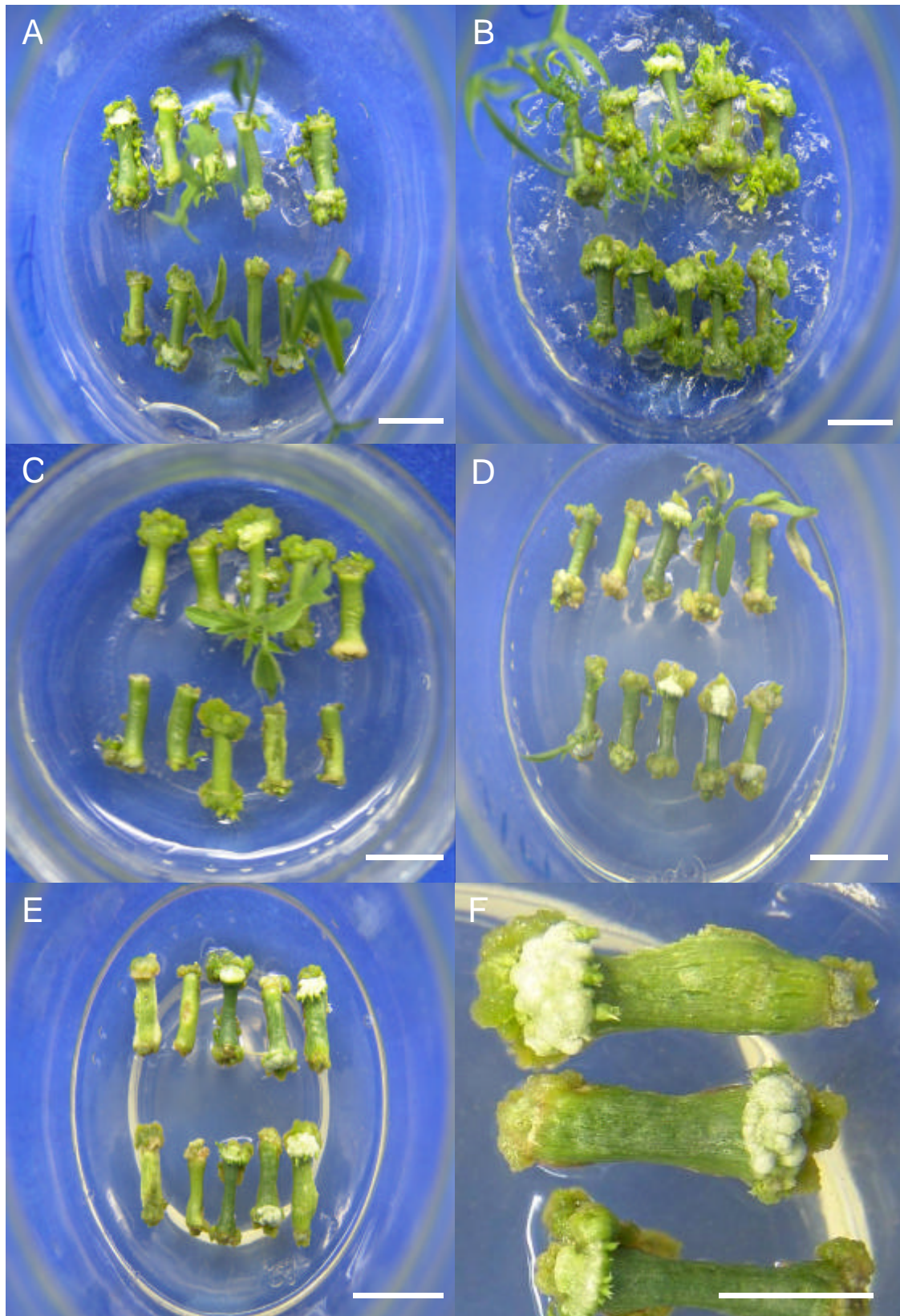
**Figura 1-** Respostas morfogênicas de explantes de hipocótilo de *P. cincinnata*. **A** - Freqüência média de regeneração. **B** – Número médio de ramos formados por explante. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (p 0,05)

Pode-se verificar um comprometimento da morfogênese no tratamento com adição do inibidor (MGBG), sendo que para frequência média de ramos houve diferença estatística com relação aos demais tratamentos. Não foi observada diferença temporal com relação a formação de gemas em nenhum dos tratamentos.

Nos tratamentos com SPD, SPM e MGBG foram observados níveis iniciais mais elevados de acúmulo de etileno, contudo, observou-se redução destes níveis ao sexto dia acompanhando o padrão de acúmulo dos demais tratamentos, sendo observado um pico de concentração no nono dia de cultivo. Apenas no tratamento com MGBG observou-se um incremento ao final de trinta dias de cultivo (Figura 2).



**Figura 2** – Níveis de acúmulo de etileno (pmol.g<sup>-1</sup>MF) ao longo do período de indução de organogênese em explantes derivados de hipocótilo de *P. cincinnata*.



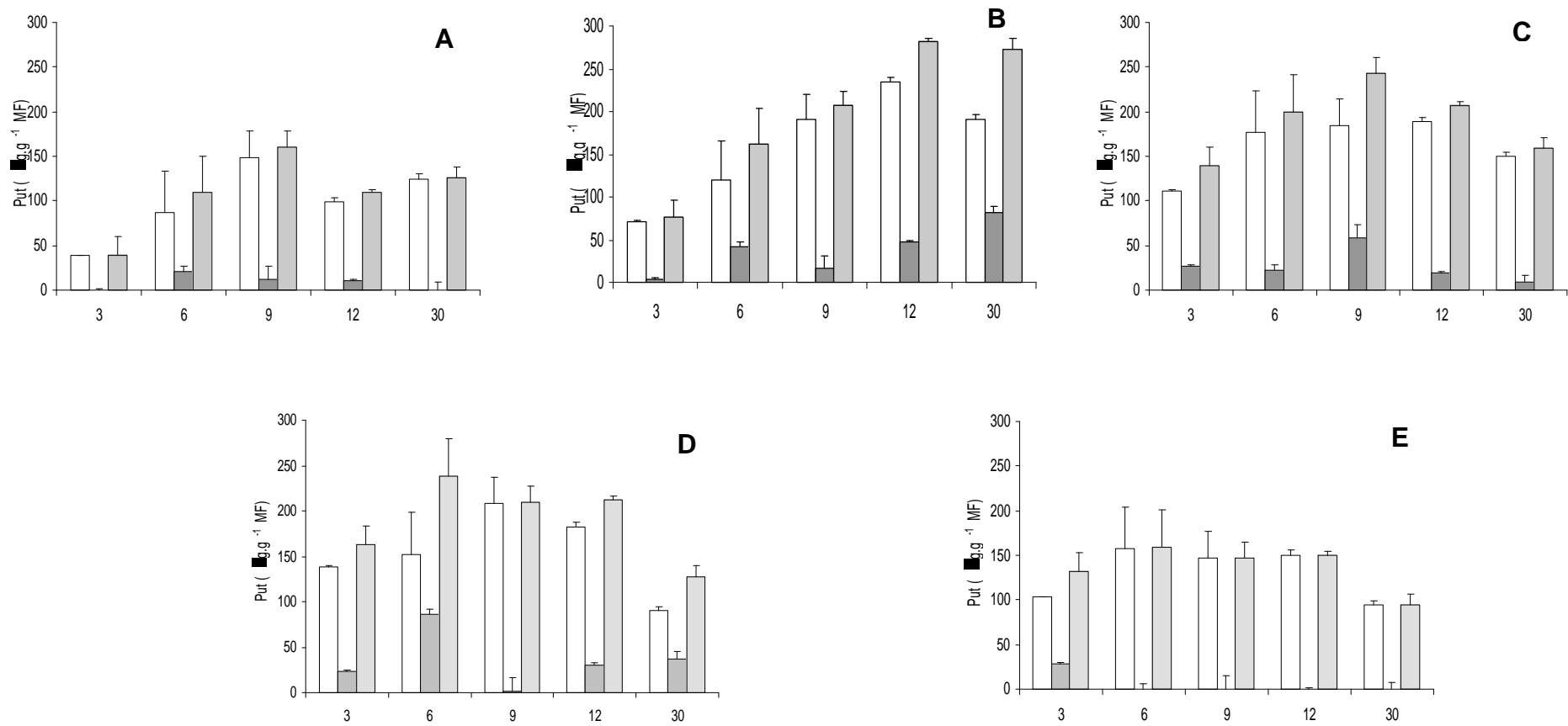
**Figura 3** – Respostas morfológicas de explantes de hipocótilo de *P. cincinnata* cultivados em meio de regeneração, aos 30 dias de cultivo: sem suplementação (A), com putrescina (B), com espermidina (C), com espermina (D), com MGBG (E), detalhe da resposta ao tratamento com MGBG (F). Barras A – E =10mm; F = 5mm.

O MGBG não se mostrou eficiente com relação à inibição da biossíntese de SPD e SPM, sendo que os níveis foram semelhantes aos encontrados no tratamento controle (Figuras 4, 5 e 6).

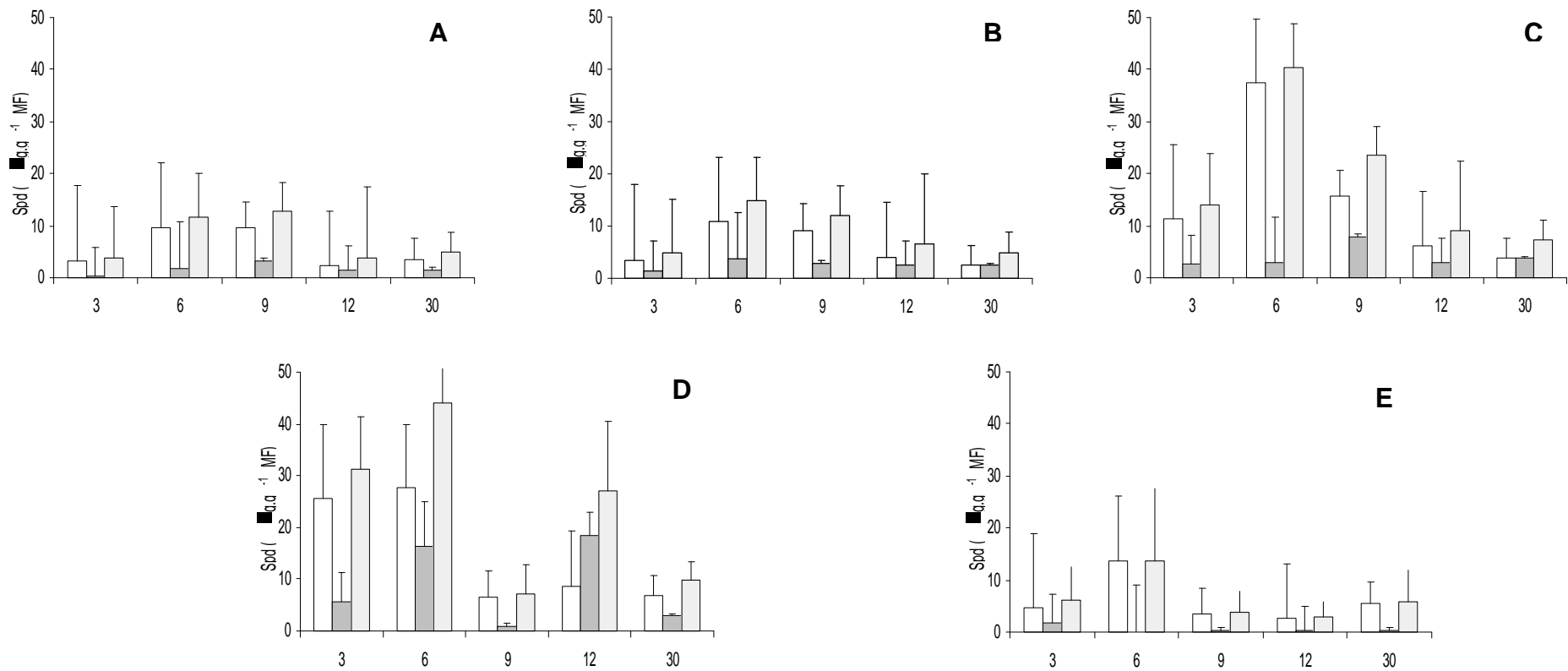
A razão PUT / (SPD + SPM) no tratamento com MGBG apresentou pico ao 12º dia de cultivo, sendo superior ao observado no tratamento com PUT (Figura 8).

Foi observado aumento nos níveis de poliaminas totais nos tratamentos em que houve adição de poliaminas (Figura 7).

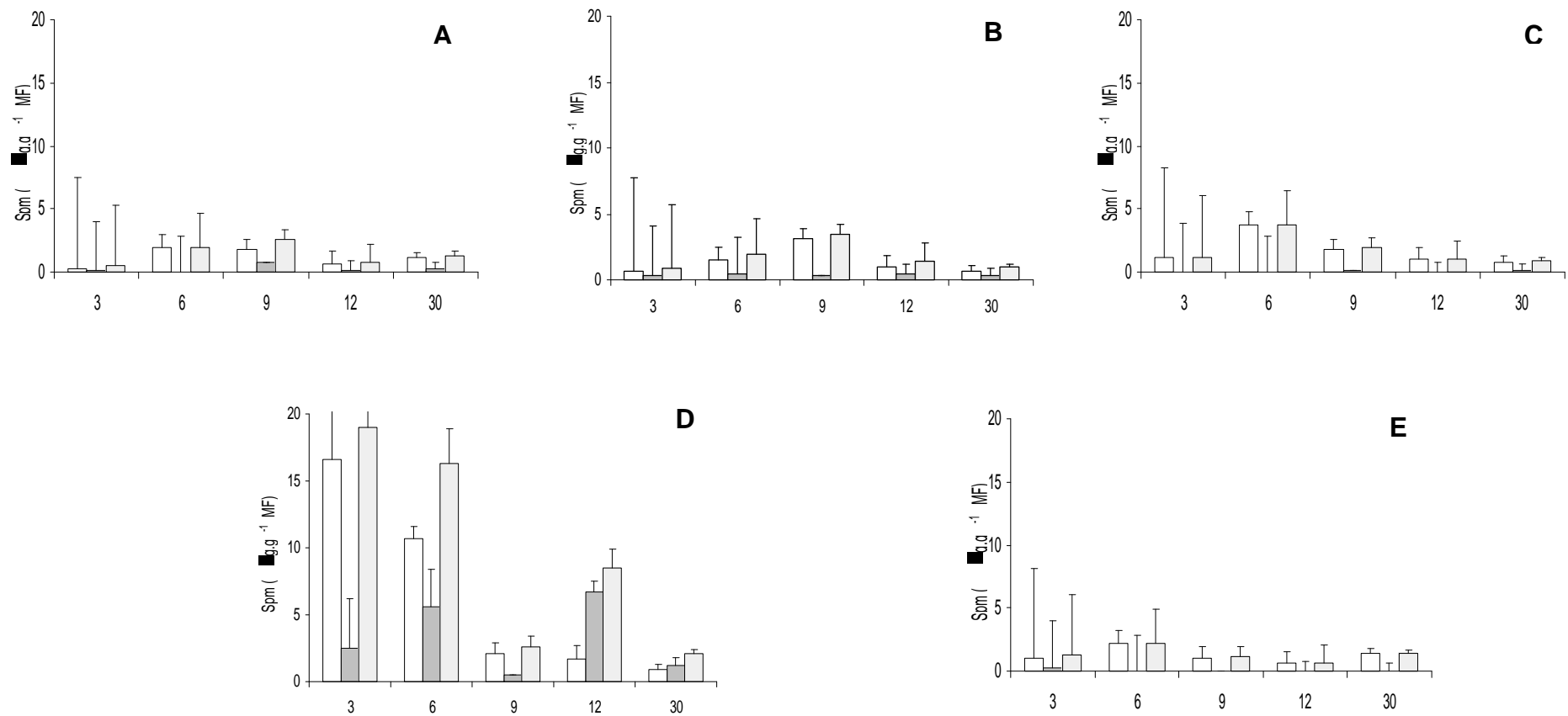
No tratamento com SPM observou-se aumento dos níveis de SPD, sugerindo que as poliaminas podem ser interconvertíveis (Figura 5).



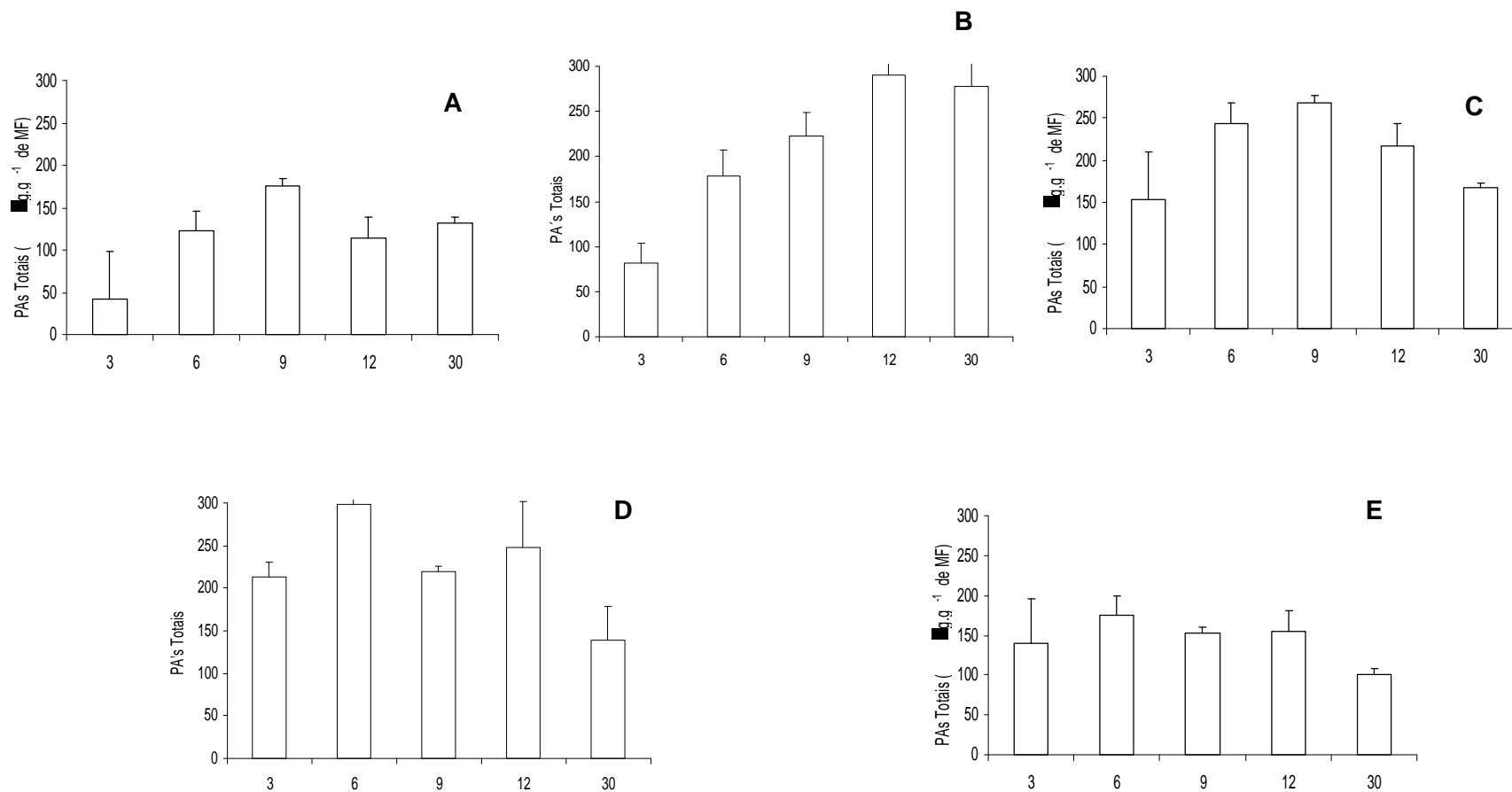
**Figura 4** – Níveis de Putrescina ( $\mu\text{g. g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - 1mM Putrescina; **C** - 1mM Espermidina; **D** - 1mM Espermina; **E** - 1mM MGBG. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



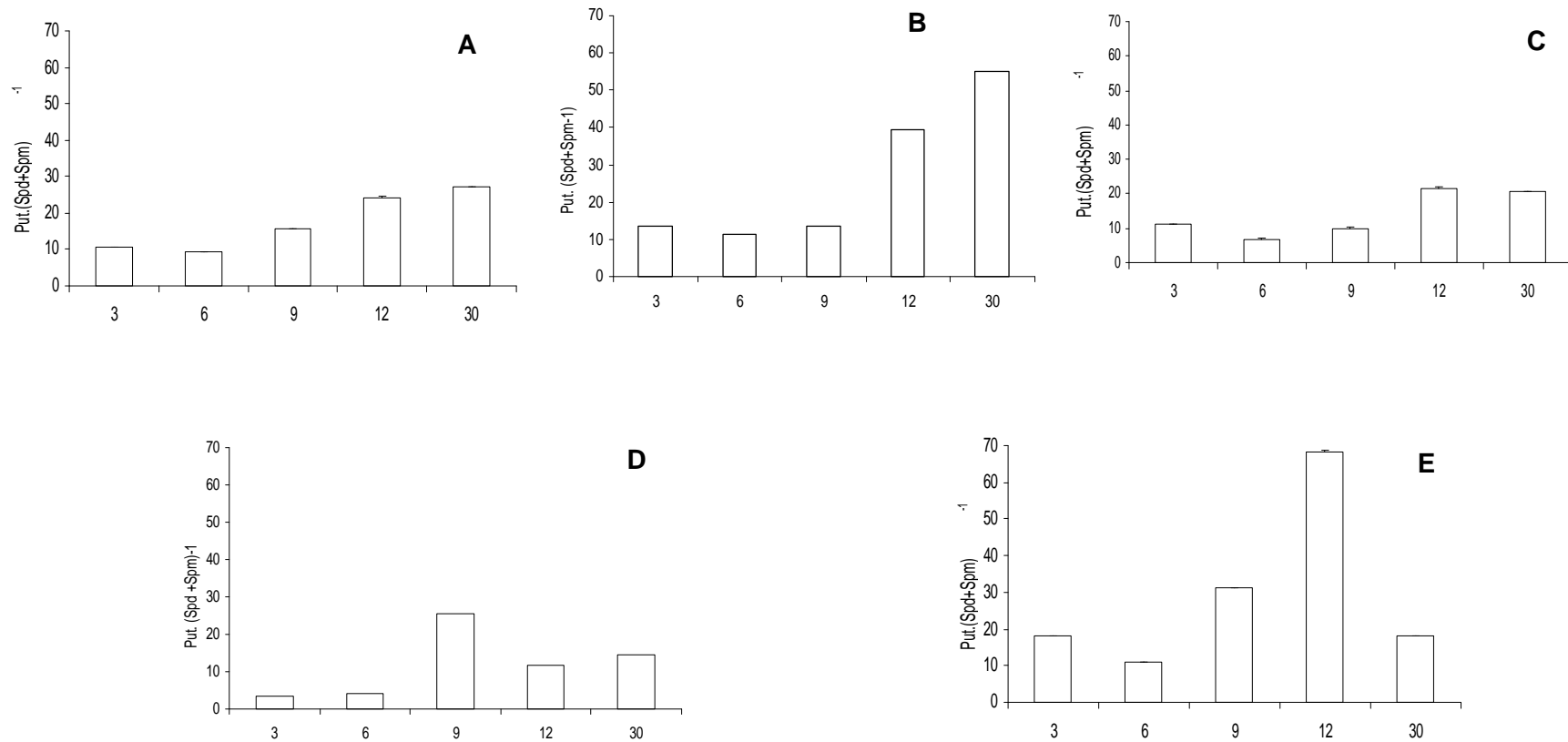
**Figura 5** - Níveis de Espermidina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - 1mM Putrescina; **C** - 1mM Espermidina; **D** - 1mM Espermina; **E** - 1mM MGBG. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



**Figura 6** – Níveis de Espermina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** - Controle; **B** - 1mM Putrescina; **C** - 1mM Espermidina; **D** - 1mM Espermina; **E** - 1mM MGBG. □ Livres ■ Conjugadas ▨ Totais



**Figura 7** – Poliaminas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** – Controle; **B** – 1mM de Putrescina; **C** – Espermidina; **D** – Espermina; **E** - MGBG



**Figura 8** – Razão PUT/(SPD +SPM) em explantes de hipocótilo de *Passiflora cincinnata*. **A** – Controle; **B** – 1mM de Putrescina; **C** – Espermidina; **D** – Espermina; **E** - MGBG

#### 4- DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem se dado um enfoque especial com relação as poliaminas e suas funções, especialmente por se apresentarem como importantes moduladoras de processos biológicos como divisão celular, crescimento e diferenciação (Walden *et al.*, 1997; Malmberg *et al.*, 1998; Martin-Tanguy, 2001; Kakkar e Sawhney, 2002).

A suplementação com poliaminas não alterou significativamente a resposta organogênica, contudo, a utilização do inibidor MGBG reduziu as respostas tanto com relação a freqüência como o número de ramos formados.

Observa-se que no 12° dia de cultura, período no qual há alongamento das gemas, no tratamento com MGBG verificou-se elevada relação PUT/(SPD + SPM). Santa-Catarina (2005) observou a redução do crescimento de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* quando tratadas com MGBG, porém não houve inibição do desenvolvimento dos embriões somáticos.

No tratamento com MGBG verificou-se valores elevados de etileno, semelhantes aos observados nos tratamentos com SPD e SPM, diferindo apenas no período final de cultivo, sugerindo que a adição do inibidor ou dos produtos finais da atividade da enzima descarboxilase da SAM favoreceram a biossíntese de etileno, contrariando o proposto por Turano e colaboradores (1997) que trabalhando com *Glycine max* sugeriram que os produtos finais da biossíntese de etileno e poliaminas exercem pouco ou nenhum efeito sobre as vias de síntese de ambos.

Com relação aos níveis de poliaminas, não foi observada diferença entre o controle e tratamento com MGBG. O fato pode ser explicado pela não especificidade do inibidor (Malmberg, 1998; Kakkar e Sawhney, 2002), ou pelo fato de que quando SAM descarboxilado é um fator limitante, homoserina e ácido aspártico podem ser utilizados como precursores alternativos para biossíntese de SPD e SPM (Park e Lee, 1994). Além disso, a inibição da biossíntese está na dependência da concentração do inibidor e do sistema vegetal utilizado, sendo que talvez a concentração utilizada tenha ficado abaixo da necessária para promover a inibição (Santa-Catarina, 2005).

Marbach (1998) observou, em *Solanum melongena*, que a adição de PUT foi efetiva em aumentar a embriogênese somática, enquanto SPD foi mais

efetiva em aumentar a calogênese. Contudo no presente estudo, os tratamentos com diferentes poliaminas não foram mais efetivos com relação a resposta morfogênica, apesar de apresentarem diferentes níveis de poliaminas

No tratamento com SPM observou-se aumento dos níveis de SPD, demonstrando que as poliaminas são interconversíveis. Monteiro e colaboradores (2002) observaram que a espermidina adicionada pode ser oxidada pela PAO e parcialmente metabolizada em putrescina. A síntese da descarboxilase da SAM é inibida pela SPD, mas é aumentada em resposta ao incremento de PUT (Buchanan *et al.*, 2000)

Segundo Bouchereau e colaboradores (1999) a SPM pode ser considerada como a poliamina mais ativa, apresentando um papel de proteção contra injúrias (Kuthanová *et al.*, 2004) e de controle de radicais livres (Li *et al.*, 2004), sendo observado incremento na biossíntese de SPM em condições de maior estresse (Park e Lee, 1994). SPD mostrou-se eficaz nas etapas de iniciação da embriogênese, enquanto a SPM foi eficaz nas etapas de desenvolvimento e crescimento das plantas (Kevers *et al.*, 2002). SPD e SPM exibem efeitos fisiológicos diferentes na membrana celular em comparação a putrescina. O ponto-chave na prevenção de injúrias na membrana dos tilacóides em folhas submetidas a estresse osmótico está nos níveis celulares de SPD e SPM (Besford *et al.*, 1993).

A competição entre a biossíntese de poliaminas e etileno é controversa, sendo que alguns trabalhos consideram uma competição de alta intensidade com reflexos acentuados na morfogênese (Minocha e Minocha, 1995; Aziz *et al.* 1997; Andersen *et al.*, 1998; Scaramagli *et al.*, 1999), enquanto outros relatam uma menor intensidade de maneira que a resposta morfogênica é independente desta interação (Zhu e Chen, 2005; Paschadilis e Roubelakis-Angelakis, 2005).

Calheiros e colaboradores (1994) observaram que, em baixas concentrações, as poliaminas podem estimular a síntese de etileno. Plantas de tomate com inserção do gene SAM descarboxilase apresentaram aumento nos níveis de poliaminas concomitante com aumento nos níveis de etileno, sem que houvesse alteração na regulação temporal do amadurecimento (Metha *et al.*; 2003).

O acúmulo de poliaminas pode causar mudanças qualitativas na atividade transcricional e pode afetar a população de receptores de etileno ou um ou mais componentes da via de transdução de sinais do etileno (Metha *et al.*, 2003).

A idéia de hormônios específicos para o desenvolvimento pode ser considerada uma idéia errônea, pois na realidade, a regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento se dá por inúmeras conexões e níveis de interações (Gaspar *et al.*, 2003).

Considerando-se que o meio com adição de MGBG foi o único tratamento onde foi observada supressão da resposta organogênica, comparando se os níveis de etileno e poliaminas aos demais tratamentos pode-se sugerir que a capacidade morfogênica está relacionada a uma interação entre poliaminas e etileno que permita a divisão e diferenciação celular. A interação entre etileno e poliaminas aparenta ser um fator preponderante para a definição da divisão, sendo a regulação temporal a peça chave para a definição da transdiferenciação.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, S.E.; BASTOLA, D.R.; MINOCHA, S.C. (1998). Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant Physiology**, **116**: 299-307.

AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY, J.; LARHER, F. (1997). Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. **Plant Growth Regulation**, **21**: 153–163.

BESFORD, R.T.; RICHARDSON, C.M.; CAMPOS, J.L.; TIBURCIO, A.F. (1993). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes of thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. **Planta**, **189**: 201-206.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, **140**: 103-125.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. pp. 911-915.

CALHEIROS, M.A.P.; VIEIRA, L.G.E.; FUENTES, S.R.L. (1994). Effects of exogenous polyamines on direct somatic embryogenesis in coffee. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **6**: 109-114.

DESAI, H.V.; MEHTA, A.R. (1985). Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, **119**: 45-53.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. (1995). Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (ed.) Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. 2<sup>nd</sup>. ed. Dordrecht, Kluwer Academic Press, 158 – 178.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CRÊVECOELR, M.; PENNEL, G.L.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. (2003). Changing concepts in plant hormone action. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, **39**: 85-106.

KAKKAR, R.K.; SAWHNEY, V.K. (2002). Polyamine research in plants – a changing perspective. **Physiologia Plantarum**, **116**: 281-292.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. (2002). The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **70**: 181–188.

KUMAR, A.; ALTABELLA, T.; TAYLOR, M.A.; TIBURCIO, A.F. (1997). Recent advances in polyamine research. **Trends in Plant Science**, **2**: 124-130.

KUTHANOVÁ, A.; GEMPERLOVÁ, L.; ZELENKOVÁ, S.; EDER, J.; MACHACKOVÁ, I.; OPATRNY, Z.; CVIKROVÁ, M. (2004). Cytological changes and alterations in polyamines contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, **42**: 149-156.

- KUZNETSOV, V.V.; RAKITIN, V.Y.; SADOMOV, N.G.; DAM, D.V.; STETSENKO, L.A.; SHEVYAKOVA, N.I. (2002). Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants? **Russian Journal of Plant Physiology**, **49**: 120-130.
- LI, C.; JIAO, J.; WANG, G. (2004). The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. **Plant Science**, **166**: 303-315.
- LIN, P.P.C.; EGLI, C.B.; LI, G.M.; MECKEL, L. (1984). Polyamine titer in the embryonic axis and cotyledons of *Glycine max* L. during seed growth and maturation. **Plant Physiology**, **76**: 366-371.
- MAATAR, A.; HUNAUT, G. (1997). Influence des régulateurs de croissance sur la teneur des tissus en polyamines libres lors de l'induction de l'embryogenèse somatique chez le fenouil (*Foeniculum vulgare* Miller). **Plant Biology and Pathology**, **320**: 245-251.
- MALMBERG, R.L., WATSON, M.B., GALLOWAY, G.L., YU, W. (1998). Molecular genetic analyses of plant polyamines. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **17**: 199-224.
- MANOHARAN, K.; GNANAM, A. (1992). Growth stimulation by conditioned medium and spermidine in low-density suspension cultures of rice. **Plant Cell Physiology**, **33**: 1243-1246.
- MARBACH, P.A.S. (1998). **Calogênese e embriogênese somática em berinjela** (*Solanum melongena* L.). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Viçosa, UFV. 73p.
- MARTIN-TANGUY, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regulation**, **34**: 135-148.
- MENGOLI, M.; BAGNI, N. (1992). Polyamines and somatic embryogenesis in higher plants. **International Association of Plant Tissue Culture Newsletter**, **68**: 2-8
- METHA, R.A.; CASSOL, T.; LI, N.; ALI, N.; HANDA, A.K.; MATTOO, A.K. (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life. **Nature Biotechnology**, **20**: 613-618.
- MINOCHA, S.C.; MINOCHA, R.C. (1996). Role of polyamines in somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds. vol. 30 Springer Verlag. New York, pp. 33-50.
- MONTEIRO, M.; KEVERS, C.; DOMMES, J.; GASPAR, T. (2002). A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **68**: 225-232.
- NEGREL, J.; LHERMINIER, J. (1987). Peroxidase mediated integration of tyramine into xylem cell walls of tobacco leaves. **Planta**, **72**: 494-501
- PARK, K.Y., LEE, S.H. (1994). Effects of ethylene and auxin on polyamine levels in suspension-cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, **90**: 382-390.

- PASCHALIDIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. **Plant Physiology**, **138**: 2174-2184.
- PETRI, C.; ALBUQUERQUE, N.; PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. (2005). Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **82**: 105–111.
- SANTA-CATARINA, C. (2005). **Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos da embriogênese de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas/ USP. 117p
- SCARAMAGLI, S.; BIONDI, S.; CAPITANI, F.; GEROLA, P.; ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P. (1999). Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Physiologia Plantarum**, **105**: 367-376.
- SCOCCIANI, V.; SGARBI, E.; FRATERNALE, D.; BIONDI, S. (2000). Organogenesis from *Solanum melongena* L. (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. **Protoplasma**, **211**: 51- 63.
- SHEN, H.; GASTON, A.W. (1985). Correlations between polyamines ratios and growth patterns in seedling roots. **Plant Growth Regulation**, **3**: 353-363.
- SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, **160**: 1229-1235.
- TIBURCIO, A.F.; GENDY, C.A.; TRAN THANH VAN, K. (1989). Morphogenesis in tobacco sub epidermal cells: putrescin as marker of root differentiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **19**: 43-54.
- TURANO, F.J.; KRAMER, G.F.; WANG, C.Y. (1997). The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. **Physiologia Plantarum**, **101**: 510-518.
- WALDEN, R.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F. (1997). Polyamines: Small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiology**, **113**: 1009-1013.
- YADAV, J.S.; RAJAM, M.V. (1997). Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal of Experimental Botany**, **313**: 1537-1545.
- ZHU, C.; CHEN, Z. (2005). Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **81**:45–53.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Foi observada correlação entre a resposta morfogênica e os picos de etileno e poliaminas, sendo que os atrasos nos níveis máximos observados em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener corresponderam ao atraso da organogênese quando comparado com *P. cincinnata* Masters.

- Verificou-se que a cultura *in vitro* de *Passiflora* em estádios de rediferenciação, caracterizada por apresentar altas taxas de expansão e alongamento, apresenta conteúdos elevados de etileno associados a altos conteúdos de poliaminas, sugerindo que a competição entre as duas rotas biossintéticas é altamente regulada e plástica.

- Sugere-se que uma relação entre poliaminas e etileno seria um dos fatores responsáveis por desencadear, estimular e/ou propiciar o processo morfogênico.

- Aparentemente a interação entre etileno e poliaminas mostra-se como um dos fatores para a definição da diferenciação, sendo a regulação temporal das concentrações a peça chave para a transdiferenciação.