

RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE

FATORES DE ESTRESSE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E NA
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Passiflora edulis* SIMS f. *flavicarpa* DEGENER

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

VIÇOSA
BRASIL – MINAS GERAIS
2006

RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE

FATORES DE ESTRESSE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E NA
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Passiflora edulis* SIMS f. *flavicarpa* DEGENER

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

APROVADA: 08 de agosto de 2006.

Prof. José Maria Moreira Dias
(Co-Orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)

Prof. Mário Puiatti



Prof. José Carlos Lopes

Prof. Claudio Horst Bruckner
(Orientador)

Aos meus pais Otacílio (in memoriam) e Ivone,

Dedico

A minha esposa, Cristiane

A meu filho Gabriel

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e, em particular, ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o curso.

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

Ao Professor Claudio Horst Bruckner, pela orientação científica, profissional e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor José Maria Moreira Dias, pelas sugestões, disponibilidade nas correções da tese e amizade durante todo o curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pelas sugestões, pela ajuda constante, e amizade durante todo o curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. Paulo César Stringheta pelas sugestões, pela ajuda constante nas análises de pigmentos.

À Professora Renata Maria Strozi Alves Meira, pela disponibilidade e auxílio nas análises de microscopia.

Ao Professor José Carlos Lopes, pela orientação científica e profissional, amizade durante todo o curso de Graduação em Agronomia e Pós-Graduação.

A todos os professores envolvidos direta ou indiretamente na minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, Rita de Cássia Mendes, Gizella Machado Ventura, Virginia Silva Carvalho, Delcio de Castro Felismino, Victor Hugo, Edson, pela alegre convivência, pela amizade, carinho e disponibilidade em ajudar.

À Renata Vianna Lima, do Laboratório de Análises e Tecnologia de Sementes, pela ajuda nas análises de sementes.

Ao Rogério Ferreira Ribas (“Rogerinho”), do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, pela ajuda nas análises de fluorescência.

Ao amigo Alan Carlos Costa, do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, pela ajuda nas análises de trocas gasosas.

À Letícia, do Laboratório de Cultura de Tecidos II, pela ajuda nas análises enzimáticas.

À Raquel, do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela ajuda constante nas análises anatômicas.

À Priscila pela ajuda nas análises de pigmentos.

Aos funcionários Valério e Dona Lídia, pela ajuda constante no Laboratório de Pigmentos.

Aos colegas do Laboratório de Pós-Colheita, pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

Aos meus colegas de curso, em especial, Alexandre Parizotto, Américo Wagner Junior, Leonarda, Leonardo pela paciência, pelos ensinamentos e pelos momentos de alegria e de mau-humor compartilhados.

Aos meus amigos Fábio Ribeiro Pires, Victor Martins Maia, Jacson Rondinelle da Silva Negreiros, Virgínia de Souza Álvares, Rita de Cássia Mendes, Alan Carlos Costa, aos amigos técnicos, aqui representados por Márcio Antônio Rocha de Oliveira, Cenira Silva Fialho, Robson, Mara Rodrigues, José Roberto, Vicente e Juca por todos os momentos felizes compartilhados.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Aos meus padrinhos Victor Emanuel Aucuri e Aurora D'Ângelo Aucuri.

Aos meus avós paternos Antônio Sebastião Alexandre e Venina Augusta Alexandre e maternos Attilano Sobreira e Silvia Valentim Sobreira.

À minha esposa, Cristiane e o meu filho Gabriel, pelo amor, incentivo, dedicação e enorme contribuição em todos os momentos.

À minha família, pela confiança, apoio e compreensão durante toda a minha vida.

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

BIOGRAFIA

RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE, filho de Otacílio Antônio Alexandre e Ivone Sobreira Alexandre, nasceu no dia 06 de abril de 1972 em Alegre, no Estado do Espírito Santo.

No ano de 1999, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, Espírito Santo.

Em março de 2002, concluiu o curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em setembro de 2002 iniciou, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Curso de Doutorado em Fitotecnia, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2006.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
REVISÃO DE LITERATURA	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7

CAPÍTULO I

Germinação de sementes de progênies de *Passiflora edulis* Sims f.
flavicarpa Degener submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao
armazenamento

RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Características avaliadas	15
2.1.1. Teor de água das sementes	15
2.1.2. Germinação	15
2.1.3. Condutividade elétrica	16
2.1.4. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)	16
2.1.5. Padrões isoenzimáticos	17
2.2. Delineamento experimental	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. Teor de água das sementes	19
3.2. Vigor	20
3.3. Germinação	25
3.4. Condutividade elétrica	30
3.5. Peroxidação de lipídios	32
3.6. Isoenzimas	33
3.6.1. Álcool desidrogenase (ADH)	33

3.6.2. Malato desidrogenase (MDH)	34
4. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

CAPÍTULO II

Efeito da benzilaminopurina (BAP) na organogênese *in vitro* e na absorção de nutrientes em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener

RESUMO	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Fase de obtenção de plântulas axênicas	44
2.2. Fase de cultivo dos segmentos de hipocótilo	45
2.3. Características avaliadas	45
2.4. Delineamento experimental	45
3. RESULTADOS	45
3.1. Experimento I	45
3.2. Experimento II	49
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

CAPÍTULO III

Estresse foto-oxidativo durante a morfogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener mediado por diferentes irradiâncias

RESUMO	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas	62
2.2. Fase de cultivo dos segmentos de hipocótilo	64
2.3. Características avaliadas	66
2.3.1. Organogênese <i>in vitro</i>	66

2.3.2. Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD); catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)	68
2.3.2.1. Peroxidase (POD)	68
2.3.2.2. Catalase (CAT)	68
2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD)	69
2.3.2.4. Quantificação de proteínas	69
2.3.3. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)	69
2.3.4. Produção de etileno (C ₂ H ₄) e dióxido de carbono (CO ₂)	70
2.3.5. Determinação dos pigmentos foliares	71
2.3.6. Análise de cor	71
2.4. Delineamento experimental	72
3. RESULTADOS	72
4. DISCUSSÃO	84
5 CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

CAPÍTULO IV

Estresse foto-oxidativo durante o crescimento *in vitro* de ápices caulinares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, sob diferentes irradiâncias

RESUMO	101
1. INTRODUÇÃO	102
2. MATERIAL E MÉTODOS	103
2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas	103
2.2. Fase de cultivo dos ápices caulinares	104
2.3. Características avaliadas	105
2.3.1. Análise de crescimento	105
2.3.2. Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD); catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)	105
2.3.2.1. Peroxidase (POD)	106
2.3.2.2. Catalase (CAT)	106
2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD)	106

2.3.2.4. Quantificação de proteínas	107
2.3.3. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)	107
2.3.4. Produção de etileno (C ₂ H ₄) e dióxido de carbono (CO ₂)	108
2.3.5. Determinação dos pigmentos foliares	108
2.3.6. Análise de cor	109
2.4. Delineamento experimental	109
3. RESULTADOS	109
4. DISCUSSÃO	122
5 CONCLUSÕES	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

CAPÍTULO V

Atividade fotossintética e fluorescência da clorofila em plântulas de
Passiflora edulis Sims f. *flavicarpa* Degener, cultivadas *in vitro*, sob
diferentes irradiâncias

RESUMO	136
1. INTRODUÇÃO	137
2. MATERIAL E MÉTODOS	138
2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas	138
2.2. Fase de cultivo dos ápices caulinares	139
2.3. Características avaliadas	140
2.3.1. Determinação das trocas gasosas	140
2.3.2. Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	141
2.4. Delineamento experimental	142
3. RESULTADOS	144
4. DISCUSSÃO	152
5 CONCLUSÕES	158
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
CONCLUSÕES GERAIS	166

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – ácido indolacético

BAP – 6-benzilaminopurina

CAT – catalase

ETR – taxa de transporte de elétrons

F_m – fluorescência máxima

F_o – fluorescência inicial

F_v – fluorescência variável

F_v/F_m – fluorescência variável/fluorescência máxima (rendimento quântico potencial)

MDA – malondialdeído

MS – meio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962)

MSM – meio de cultivo MS modificado

POD – peroxidase

q_N e NPQ – dissipação não fotoquímica

q_P – dissipação fotoquímica

ROS – espécies reativas do oxigênio

SOD – superóxido dismutase

$\Delta F/F_m'$ – rendimento quântico efetivo

RESUMO

ALEXANDRE, Rodrigo Sobreira Alexandre, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Fatores de estresse na germinação de sementes e na propagação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener.** Orientador: Claudio Horst Bruckner. Co-orientadores: José Maria Moreira Dias, Wagner Campos Otoni e Paulo César Stringheta.

O estresse oxidativo resulta em uma série de reações de espécies reativas do oxigênio (ROS) que são consideradas prejudiciais às membranas biológicas. Além disso, em condições estressantes, os tecidos podem produzir e liberar gases, como o etileno e o CO₂, sendo o primeiro, um dos responsáveis pela clorose, senescência e abscisão foliar. Elevadas irradiâncias sobre os tecidos fotossintetizantes resulta em uma série de reações de estresse denominadas de fotoinibição. O uso de fitorreguladores, também pode alterar a fisiologia da planta e conduzi-la a uma condição estressante. Em condições fisiológicas normais, a produção desses radicais é controlada adequadamente por agentes desintoxicadores. Na espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, a germinação das sementes é genótipo-dependente, e o armazenamento beneficia a germinação das mesmas. O BAP influencia a absorção de nutrientes minerais pelos segmentos hipocotiledonares e o tempo de imersão nesta citocinina está relacionado com a formação de estruturas organogênicas. A irradiância incidida sobre os segmentos hipocotiledonares e ápices caulinares influencia a taxa de emissão de etileno e CO₂. Há uma relação entre produção de etileno e biossíntese ou degradação de pigmentos foliares. No processo organogênico a uma relação direta entre a formação de brotos, nas maiores irradiâncias, com a elevação da atividade da POD. O crescimento dos ápices caulinares está relacionado com a inativação das enzimas SOD e CAT. E ainda, que os níveis crescentes de MDA indicam que apenas o aumento na atividade da CAT não é suficiente para remover as ROS. A elevação dos níveis de irradiância afeta o rendimento quântico potencial do FSII, e este, por apresentar comportamento semelhante ao da atividade fotossintética é indicado para mensurar os níveis de estresse nas plântulas. O sistema de avaliação da atividade fotossintética, contribuiu para analisar plântulas do maracujazeiro cultivadas *in vitro*. Neste trabalho, os segmentos hipocotiledonares e as plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* adaptaram-se melhor às menores irradiâncias.

ABSTRACT

ALEXANDRE, Rodrigo Sobreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of, 2006. **Stressful factors in seed germination and *in vitro* propagation of *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener.** Adviser: Claudio Horst Bruckner. Co-Advisers: José Maria Moreira Dias, Wagner Campos Otoni and Paulo César Stringheta.

The oxidative stress results into reaction series of the reactive oxygen species (ROS) that are considered as detrimental to biological membranes. In addition, the tissues can produce and liberate gases such as the ethylene and CO₂, as being the first one responsible for the chlorosis, senescence and leaf abscission. High irradiance on the photosynthesizing tissues results into a stress reaction series so-called photoinhibition. Using the phytohormones can also change the physiology of the plant, therefore inducing it to stressful condition. Under normal physiologic conditions, the production of those radicals is appropriately controlled by deintoxicant agents. In the species *P. edulis* f. *flavicarpa*, the germination of the seeds is genotype-dependent, whereas storage is beneficial to their germination. BAP affects the absorption of mineral nutrients through the hypocotyledonous segments, whereas the soaking time in this cytokinin is related to the formation of organogenetic structures. The irradiance incidence on the hypocotyledonous segments and stem apices affects the ethylene emission rate and CO₂. There is a relationship between the ethylene production and biosynthesis or leaf pigment degradations. In the organogenetic process, a direct relationship occurs between the sprout formations at the highest irradiances and the increase in POD activity. The growth of the stem apices is related to inactivation of the enzymes SOD and CAT. Yet, increasing MDA levels indicate that only the increased CAT activity is not enough to remove ROS. The increase in the irradiance levels affects the potential quantum production of FSII, whereas this one is indicated for measuring the plantlet stress levels because it shows a behavior similar to photosynthetic activity'. The photosynthetic activity evaluation system contributed to the analysis of the passion fruit plant plantlets cropped *in vitro*. In this study, hypocotyledonous segments and the *P. edulis* f. *flavicarpa* plantlets showed a better adaptation to the lowest irradiances.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com produção aproximada de 448.000 toneladas anuais, seguido do Equador e Colômbia com 85.000 e 30.000 toneladas, respectivamente. Os maiores exportadores mundiais são Equador, Colômbia e Peru (ITI Tropicals, 2005). Apesar de o Brasil ser considerado o maior produtor mundial, ele não está incluído no grupo dos maiores exportadores mundiais, tendo em vista que o consumo interno é maior que sua produção. Para alterar essa situação, são necessários avanços tecnológicos, como a manutenção de bancos de germoplasma em programas de melhoramento genético, para a obtenção de indivíduos com características agrônômicas desejáveis, atingindo, assim, índices mais elevados de produção.

Dentre essas perspectivas tecnológicas, a cultura de células e tecidos vegetais aplicada à cultura do maracujazeiro consiste numa estratégia que vem contribuir com avanços na propagação *in vitro*, por meio, principalmente, da organogênese direta, a partir de diversos tipos de explantes como em entrenós (Moran Robles, 1979); segmentos de folhas (Kawata et al., 1995); endosperma (Mohamed et al., 1996); ápices de brotos (Faria & Segura, 1997); ápices caulinares (Barbosa et al., 2001; Alexandre, 2002); cotilédones (Hall et al., 2000); discos foliares (Apezzato-da-Glória et al., 1999; Monteiro-Hara et al., 2000); segmentos internodais (Biasi et al., 2000); folhas cotiledonares (Ribas et al., 2000); segmentos de hipocótilo (Koch et al., 2001; Alexandre, 2002; Couceiro, 2002; Reis, 2003; Felismino, 2005; Dias, 2005) e organogênese indireta, como em microcalos (Dornelas & Vieira, 1993; D' Utra Vaz et al., 1993; Otoni et al., 1995; Felismino, 2005).

Apesar de haver inúmeros trabalhos com *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, pouco ainda se conhece do comportamento morfofisiológico dessa espécie *in vitro*. Diante disso, o trabalho teve o propósito de estudar:

- a) Germinação de sementes de progênies de *P. edulis* f. *flavicarpa* submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento;
- b) Efeito da benzilaminopurina (BAP) na organogênese *in vitro* e na absorção de nutrientes em *P. edulis* f. *flavicarpa*;

- c) Estresse foto-oxidativo durante a morfogênese *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* mediado por diferentes irradiâncias;
- d) Estresse foto-oxidativo durante o crescimento *in vitro* de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sob diferentes irradiâncias;
- e) Atividade fotossintética e fluorescência da clorofila em plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes irradiâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.** Viçosa:UFV, 2002. 103p. Tese de Mestrado.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.

BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v.7, n.1, p.47-54, 2001.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p.661-665, 2000.

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

DIAS, L.L.C. **Influência do etileno e poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* de maracujá (*Passiflora* sp.).** Viçosa:UFV, 2005. 76p. Tese de Mestrado.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.33, p.209-212, 1997.

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

ITI Tropicals. Disponível em: <www.passionfruitjuice.com>. Acesso em: 31 de outubro de 2005.

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

KOCH, R.C.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; POSSAMAI, J.C. Vegetative propagation of *Passiflora actinia* by semihardwood cuttings. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.165-167, 2001.

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

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.527-531, 2000.

MORAN ROBLES, M.J. Potential morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture “*in vitro*”. **Turrialba**, v.29, n.3, p.224-228, 1979.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**, v.42, n.243, p.461-468, 1995.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.

RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.237-241, 2002.

REVISÃO DE LITERATURA

Alguns dos trabalhos desenvolvidos até o momento, referentes à organogênese *in vitro* em maracujazeiro *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener, tiveram como fonte de explantes, segmentos hipocotiledonares (Barbosa, 1999; Reis, 2001; Alexandre, 2002; Couceiro, 2002; Dias, 2005; Felismino, 2005; Reis, 2005) extraídos de plântulas axênicas e estioladas, provenientes de germinação *in vitro* no escuro, em consonância com o relato de Maciel & Bautista (1997), de que as sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* são fotoblásticas negativas.

Outros pesquisadores utilizam também materiais juvenis, como cotilédones, hipocótilos e folhas de plântulas na propagação *in vitro* (Scorza & Janick, 1980; Kantarajah & Dodd, 1990; Dornela & Vierira, 1993). Kawata et al. (1995), enfocando a propagação de plantas lenhosas, mencionam a dificuldade da capacidade morfogênica de explantes adultos. Drew (1991) já havia verificado também, a dificuldade de se cultivar explantes *in vitro*, provenientes de plantas adultas de Passifloras. Couceiro (2002) menciona que segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener proporcionam maior resposta organogênica.

Dentre estes trabalhos, especificamente os de Rêgo (2001), Reis (2001), Alexandre (2002) e Couceiro (2002) demonstraram que as sementes provenientes de frutos maduros, extraídas e colocadas imediatamente para germinar *in vitro*, proporcionaram plântulas vigorosas, com tamanho e diâmetro suficientes para a extração de cinco segmentos de hipocótilo de aproximadamente 1 cm cada. Dos três trabalhos citados acima, apenas Alexandre (2002) utilizou como explante ápices caulinares com 2,0 cm de comprimento, e que continha folhas cotiledonares envolvidas por restos do rudimento seminal.

Visto que os segmentos hipocotiledonares são explantes que proporcionam melhores respostas organogênicas em *P. edulis* f. *flavicarpa*, a maneira mais prática e eficiente de consegui-los é a partir de plântulas axênicas, germinadas e crescidas *in vitro*. Entretanto isso acarreta um problema: é que para evitar a elevada variabilidade da espécie, as sementes necessitam ser extraídas de frutos colhidos de uma única planta matriz e serem armazenadas em quantidade, de modo a cobrir a demanda de sementes

para todos os experimentos planejados. Assim, estas ao serem armazenadas, podiam apresentar baixo vigor e com isso, afetar o crescimento das plântulas *in vitro*. Alexandre, Couceiro e Felismino (comunicação pessoal), ao utilizarem sementes armazenadas, por mais de 6 meses, em geladeira à 4 °C, acondicionadas em sacos de papel permeável, quando colocadas para germinar, originavam plântulas anormais, com diâmetro pequeno (muito finas) e raquíticas; e, em muitos casos, quando germinavam, apresentavam características de anormalidade, não atingindo o estágio de plântula. O uso de sementes armazenadas pode causar, além dessas perturbações fisiológicas, outras, tais como a de comprometer a capacidade morfogênica dos explantes, em função da idade dos mesmos. Schroeder & Stimart (1999) ao trabalharem com explantes de hipocótilos envelhecidos de *Antirrhinum majus* L. verificaram redução do número de brotos, influenciada, possivelmente, por níveis reduzidos de citocininas endógenas, redução da sensibilidade à citocinina exógena e redução da totipotência.

É importante ter em conta que os problemas que se apresentam no cultivo *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* iniciam com as sementes e é necessário estudá-los. Esta dificuldade com as sementes armazenadas passou a ser preocupação para os pesquisadores, já que tinham que fazer uso destas, tendo em vista que os cultivos eram contínuos. Havia então de estudar não apenas a espécie nesta condição, senão também de diferentes materiais genéticos para verificar se este fato ocorria com a espécie, ou se era devido à diferença entre genótipos.

Nos cultivos *in vitro* do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, alguns trabalhos fazem menção a sintomas de clorose encontrada em diferentes tipos de explantes (Barbosa, 1999; Reis, 2001; Alexandre, 2002; Couceiro, 2002 e Felismino, 2005). Apenas alguns destes trabalhos relacionam esse problema com determinados fatores, porém não a sua causa, como o de Barbosa et al. (2001), Reis et al. (2003) e Dias (2005) que atribuem a clorose nos tecidos, ao aumento na produção de etileno. E, ao estudarem o efeito de inibidores como o AVG (aminoetóxi-vinil-glicina), STS (tiosulfato de prata), e do sequestrador PM (perclorato de mercúrio) na biossíntese de etileno, verificaram redução na produção desse gás. Segundo estes autores, o uso dessas substâncias (AVG e STS) foi providencial para retardar ou inibir a senescência foliar e abscisão do pecíolo (Faria & Segura, 1997; Reis et al., 2003). Em outro trabalho,

Kantharajah & Dodd (1990) observaram que a permanência de explantes nodais de *P. edulis* no meio MS contendo BAP por mais de 4 semanas, levou a ficarem cloróticos e eventualmente morriam. Esses autores supõem que o acúmulo de BAP nos tecidos pode promover sintomas de toxicidade.

Apenas dois autores estudando a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* mostram as causas de sintomas de clorose em explantes cultivados nas condições *in vitro*. O primeiro foi o trabalho desenvolvido por Monteiro-Hara (2000), no qual, observaram aspecto clorótico dos explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, e relacionaram esta característica com sintomas de deficiência mineral, quando as plantas desta espécie foram cultivadas em meio MS. Entretanto, aquelas cultivadas em meio MSM (MS modificado), as folhas eram verdes e as plantas apresentaram maior tamanho. O segundo trabalho, desenvolvido por Alexandre (2002), relacionou os sintomas de clorose, tanto em estruturas organogênicas (gemas e brotos), quanto em plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, a níveis elevados de irradiância e sua associação com baixas concentrações de sacarose no meio de cultivo. Segundo o autor, o amarelecimento do limbo foliar foi bastante evidenciado, principalmente com o aumento dos níveis de irradiância, a partir de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com a clorose sendo mais perceptível em 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O autor verificou ainda, nos valores mais altos de irradiância, fotoinibição da fotossíntese, sendo mais perceptível, quando cultivou os ápices caulinares em meio com ausência de sacarose e os incubou à irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A fotoinibição, detectada a partir de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sinaliza prejuízos para o desenvolvimento normal dos ápices caulinares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.** Viçosa:UFV, 2002. 103p. Tese de Mestrado.

BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno).** Viçosa:UFV, 1999. 70p. Tese de Mestrado.

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

DIAS, L.L.C. **Influência do etileno e poliaminas sobre a morfogênese *in vitro* de maracujá (*Passiflora* sp.).** Viçosa:UFV, 2005. 76p. Tese de Mestrado.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.23-27, 1991.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *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**, v.33, p.209-212, 1997.

FELISMINO, D.C. **Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade.** Viçosa:UFV, 2005. 112p. Tese de Doutorado.

KANTHARAJA, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.35, p.337-339, 1990.

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

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efectos de la luz sobre la germinación de la parchita. **Agronomía Tropical**, v.47, n.4, p.397-408, 1997.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.527-531, 2000.

RÊGO, M.M. **Indução *in vitro* de haplóides e de poliplóides e detecção molecular de alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Viçosa:UFV, 2001. Tese de Doutorado.

REIS, L.B. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener e) associada ao etileno e a agentes geleificantes**. Viçosa, UFV, 2001. 90p. Tese de Mestrado.

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

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.

SCHROEDER, K.R.; STIMART, D.P. Adventitious shoot formation on excised hypocotyls of *Antirrhinum majus* L. (Snapdragon) *in vitro*. **HortScience**, v.34, n.4, p.736-739, 1999.

SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, n.6, p.892-897, 1980.

Germinação de sementes de progênies de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a germinação de sementes de progênies de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12x3x5 (progênies: 2, 6, 8, 14, 15, 16, 18, 22, 23, 33, 36 e 38 x tratamentos físicos no tegumento: intacto, escarificado e trincado x tempo de armazenamento: 0, 3, 6, 9 e 12 meses), com 4 repetições de 25 sementes. Avaliou-se a primeira contagem do teste de germinação (aos 14 dias), teste de germinação (aos 28 dias), condutividade elétrica, peroxidação de lipídios, padrões isoenzimáticos, da álcool desidrogenase (ADH) e da malato desidrogenase (MDH). Foram identificadas as progênies 22 e 2 como sendo as mais vigorosas no tempo zero e aos 12 meses de armazenamento, respectivamente. A progênie 2 atingiu a maior porcentagem de germinação (61,0%) sem a necessidade de tratamentos físicos no tegumento das sementes aos 12 meses de armazenamento. A progênie 2, que faz parte do grupo das sementes que apresentaram a melhor qualidade fisiológica, apresentou um dos menores valores de condutividade elétrica, conteúdo de MDA e intensidade de bandas para a MDH e maior para ADH. Com esse estudo foi possível verificar que, dentre as progênies estudadas, existe grande variabilidade quanto à qualidade fisiológica das sementes.

1. INTRODUÇÃO

Nos programas de melhoramento genético, que visam a obtenção de genótipos com alta qualidade de sementes, a diversidade genética é de fundamental importância, podendo por meios de testes de vigor, selecionar indivíduos que apresentem sementes com elevada qualidade fisiológica (Kryzanowski & França Neto, 2001).

A dureza tegumentar, descrita por Maciel et al. (1997), está relacionada ao episperma duro com evaginações internas e invaginações externas, e é um dos interesses de estudos para as espécies de maracujazeiro. Tratamentos aplicados a esta estrutura podem reduzir o tempo e até mesmo aumentar a taxa de germinação. Assim, Morley-Bunker (1974) já recomendava o uso de processos mecânicos para a remoção tegumentar e a melhoria das condições ambientais para promover germinação rápida e uniforme.

Na propagação seminífera, as sementes podem ser utilizadas tão logo sejam extraídas dos frutos ou após o armazenamento. A longevidade dessas sementes é o período no qual mantêm-se vivas, isto é, capazes de germinar, quando colocadas em condições favoráveis (Toledo & Marcos Filho, 1977). Condições ideais de armazenamento podem manter a viabilidade, ou seja, o efetivo período de vida das sementes. Becwar et al. (1983) determinaram 2 % como sendo o limite mínimo de umidade para que sementes do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* mantivessem sua viabilidade inalterada, correlacionando tal limite às características das sementes ortodoxas.

Segundo Berjak et al. (1990), as sementes ortodoxas apresentam teor de água variável durante a vida. Para essas sementes, o período de viabilidade aumenta à medida que decrescem a temperatura e a umidade do ambiente de armazenamento (Roberts, 1972). Espécies ortodoxas, ao passarem por processo de desidratação, podem permanecer por muitos anos armazenadas em temperaturas ambiente ou baixas (Roberts, 1973). Em contraste, embriões recalcitrantes não sobrevivem, quando as sementes são desidratadas ou passando por desidratação ou armazenadas a baixas temperaturas.

Hidalgo & Taveira (1996) mostraram que a manutenção das sementes de *P. nitida*, por um período de armazenamento foi benéfica, eliminando as substâncias inibidoras da germinação.

Não existe ainda no Brasil, um comércio regular de sementes selecionadas de maracujá. Isso põe em relevo a importância de se conservar as sementes em boas condições durante o armazenamento.

Coleções de plantas de distintas espécies vêm sendo mantidas na forma de sementes em câmaras frias e secas, constituindo-se, assim, bancos de germoplasma, os quais se revestem de fundamental valor para programas de melhoramento. Essa metodologia é muito interessante, já que são encontradas várias dificuldades de manter plantas no campo, como por exemplo, sob condições climáticas adversas e incidência de fitoparasitas. Utilizando-se esta forma de conservação de germoplasma, os campos são reinstalados, quando há necessidade de rejuvenecimento dos estoques (Meletti & Bruckner, 2001). Para espécies de maracujazeiro *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, há necessidade de maiores estudos, para que o tempo de preservação das sementes com a manutenção de sua viabilidade possa ultrapassar os 12 meses.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação de sementes de progênies do maracujazeiro submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia e Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES.

Frutos maduros do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener foram coletados de 12 progênies de meios-irmãos (Tabela 1) no pomar do Setor de Fruticultura da Fazenda Experimental do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Foram coletados frutos de uma única planta, dentro de cada progênie; as sementes foram extraídas seccionando os frutos pela metade, retirando-se de sua cavidade interna, a mucilagem contendo as sementes. A mucilagem foi separada das

sementes em peneira de malha fina, acrescida de cal virgem (CaO) e submetida a fricção com as mãos, de forma a remover o arilo. Executada esta operação, as sementes foram lavadas em água corrente para retirada final dos restos placentários. Depois de completamente limpas e enxaguadas, foram dispostas em folhas de papel toalha, e deixadas para secar à sombra por três dias.

Após secagem à sombra, as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos físicos no tegumento: intacto (controle, neste caso, o tegumento das sementes não foi submetido a tratamentos físicos); escarificado (em que o lado oposto à região afilada das sementes foi friccionado em lixa d' água nº 220) e trincado (em que a região equatorial ou de sutura das sementes foi colocada entre os braços de uma mini-morsa e submetida a determinada força até que ocorresse o rompimento do tegumento).

Tabela 1. Ascendência e procedência das doze progênies de meio-irmãos do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Progênies	Caracterização	Ascendência	Procedência
2	Progênie de meios-irmãos	(CS9 x P3)	Viçosa-MG
6	Progênie de meios-irmãos	Planta 1	Campos dos Goytacazes-RJ
8	Progênie de meios-irmãos	(CY6 x Sul Brasil)	Viçosa-MG
14	Progênie de meios-irmãos	(CT8 x Sul Brasil)	Viçosa-MG
15	Progênie de meios-irmãos	(CT8 x P2)	Viçosa-MG
16	Progênie de meios-irmãos	(CT8 x P3)	Viçosa-MG
18	Progênie de meios-irmãos	(CT8 x P1)	Viçosa-MG
22	Progênie de meios-irmãos	P1	Viçosa-MG
23	Progênie de meios-irmãos	P3	Viçosa-MG
33	Progênie de meios-irmãos	T16	Viçosa-MG
36	Progênie de meios-irmãos	T28	Viçosa-MG
38	Progênie de meios-irmãos		Norte do Rio de Janeiro

Executados os tratamentos físicos no tegumento, as sementes das progênies, em separado, foram usadas para formar dois lotes. O primeiro deles continha 300 sementes de cada progênie, as quais foram tratadas com imersão por dois minutos em hipoclorito

de sódio a 3%, seguida da imersão em Benlate (Benomyl 500[®]) na concentração de 2,0 g L⁻¹, por dois minutos. Após cada um dos tratamentos, as sementes foram lavadas em água destilada. Em seguida, foram distribuídas em rolos de papel Germitest[®] e incubadas em câmara de germinação tipo BOD, equipada com tubos fluorescentes OSRAM[®], com potência de 40 W m⁻², luz do dia, promovendo o conjunto de 4 lâmpadas irradiância de 30 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro), sob temperatura alternada de 20-30 °C.

O segundo lote constituiu-se de 1000 sementes para cada progênie. As sementes de cada progênie foram, acondicionadas em sacos de papel permeável e armazenadas em câmara seca regulada à temperatura de 4° C e 30% de UR. O período de armazenamento teve duração de 12 meses.

2.1. Características avaliadas

No início e a cada três meses foi determinado o teor de água das sementes (U, %), primeira contagem do teste de germinação (germinação aos 14 dias), teste de germinação (germinação aos 28 dias), condutividade elétrica, peroxidação de lipídios e padrões izoenzimáticos.

2.1.1. Teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado, pesando-se quatro subamostras de 25 sementes e transferindo-as para estufa regulada a 105 ± 3 °C, por 24 horas (Brasil, 1992). Os resultados foram calculados com base no peso úmido (Bu) e expressos em porcentagem.

2.1.2. Germinação

Este teste foi realizado com quatro subamostras de 25 sementes, para cada repetição/tratamento, distribuídas em rolos de papel Germitest[®], umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, que foram mantidos em câmaras

de germinação tipo BOD, regulada à temperatura alternada de 20-30 °C e fotoperíodo de 12/12 horas. As avaliações do teste foram feitas após 14 e 28 dias do início do teste, computando-se as plântulas normais germinadas (Brasil, 1992) e os resultados expressos em porcentagem de germinação e o vigor avaliado através da primeira contagem de germinação, realizada conjuntamente com o teste de germinação, contabilizando-se as plântulas normais presentes após 14 dias da sementeira e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.1.3. Condutividade elétrica

Foram utilizadas quatro subamostras de 25 sementes intactas e armazenadas por 12 meses para cada tratamento, pesadas em balanças de precisão de 0,01g e colocadas em copos plásticos (6 cm de base) contendo 75 mL de água desionizada, mantidas em câmara tipo BOD regulada à temperatura constante de 25 °C, onde permaneceram incubadas por um período de 24 horas. Decorrido este período, a condutividade elétrica da solução foi determinada através da leitura em condutímetro de bancada Digimed Cd-20 conforme metodologia descrita por Krzyzanowski et al. (1991) e os valores médios obtidos foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de semente.

2.1.4. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica das sementes foi expressa como teor de malondialdeído (MDA), determinado pelo método de TBARS (Buege & Aust, 1978). Amostras de sementes dentro de cada progênie (100 mg de matéria fresca) foram homogeneizadas em 5,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PMF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Retirou-se do sobrenadante uma alíquota de 1,0 mL, adicionando-lhe 4,0 mL da mistura contendo 10% (p/v) de TCA e 0,5 % de TBA, contendo 0,01% de BHT (butilhidroxitolueno). Em seguida, os tubos de ensaio contendo a mistura foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob

agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. O “branco” foi preparado sem a amostra, porém seguindo todas as outras etapas. A absorvância do sobrenadante foi lida a 535 nm e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada, utilizando-se a metodologia descrita por Dhindsa et al. (1981), conforme a seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\zeta \cdot b)$, onde, ζ (coeficiente de extinção) = $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e b (comprimento ótico) = 1 cm.

2.1.5. Padrões isoenzimáticos

Utilizou-se para análise isoenzimática amostras de sementes congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a extração, cerca de 100 mg de sementes para cada mL de solução-tampão foram macerados, utilizando almofariz e pistilo, previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo (Arimura, 1997).

Os sistemas isoenzimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho a 12% em solução tampão (Conkle et al., 1982).

No preparo do gel, foram empregados 350 mL de solução-tampão, dos quais 80 mL foram vertidos em um balão volumétrico de 1000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido no erlenmeyer e este retomado à chama, para o cozimento do amido. Em seguida, o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico (17,0 x 14,0 x 1,0 cm) sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, com a finalidade de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados à tarde e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

Para a aplicação das amostras e corrida eletroforética, retirou-se a placa de vidro e, a cerca de 2,5 cm da extremidade, fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel. As sementes maceradas em solução tampão foram aplicadas em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM (12 x 5 mm), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente a espessura do gel. Aplicou-se a solução de azul de bromofenol em tira própria, para monitorar a migração.

Em seguida, foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas, conectando-se o gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano fino Perfex previamente embebida na solução tampão específica para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos a 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman para o gel. Desligou-se o aparelho, retirou-se o gel das cubas e, em seguida, removeram-se as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Após este procedimento, conectou-se novamente o gel às cubas e ligou-se o aparelho a 200 volts, segundo metodologia utilizada por Arimura (1997). Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em quatro fatias, com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de nylon. As fatias dos géis foram, então, colocadas sobre bandejas refratárias tipo Pyrex e sobre elas foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático, conforme Borsol Filho (1995).

Para os sistemas enzimáticos álcool desidrogenase (ADH) e malato desidrogenase (MDH), as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C, no escuro, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões nos géis foram fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4 °C, com uma solução com 10% de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução com 65% (v/v) de álcool etílico, 30% (v/v) de água e 5% (v/v) de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha. A avaliação das bandas foi feita de acordo com a sua intensidade.

2.2. Delineamento experimental

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12 x 3 x 5 (progênes: 2, 6, 8, 14, 15, 16, 18, 22, 23, 33, 36 e 38 x tratamentos físicos no tegumento: intacto, escarificado e trincado x tempo de armazenamento: 0, 3, 6, 9 e 12 meses), com quatro repetições de 25 sementes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor de água das sementes

Após a extração e secagem por três dias, as sementes das doze progênies (2, 6, 8, 14, 15, 16, 18, 22, 23, 33, 36 e 38) avaliadas apresentaram 10,45; 9,97; 10,59; 9,84; 10,0; 10,48; 9,63; 10,08; 10,20; 10,36; 9,71 e 10,33% de umidade, respectivamente. A variação, portanto, entre a maior (10,59%, progênie 8) e a menor (9,63%, progênie 18) umidade foi de 0,96%. Ao longo do período de armazenamento (3, 6, 9 e 12 meses), em média, as progênies, na ordem anteriormente citada, apresentaram 8,95; 9,22; 9,22; 8,45; 8,57; 8,84; 8,33; 9,17; 9,24; 9,05; 8,97 e 9,49% de umidade, respectivamente. Isso sugere que houve redução no teor de água das sementes, sendo superior a 1 %, nas progênies 2 (1,5%), 8 (1,37%), 14 (1,39%), 15 (1,43%), 16 (1,64%), 18 (1,1%) e 33 (1,31%). As demais progênies apresentaram redução no teor de água abaixo deste índice (Figura 1).

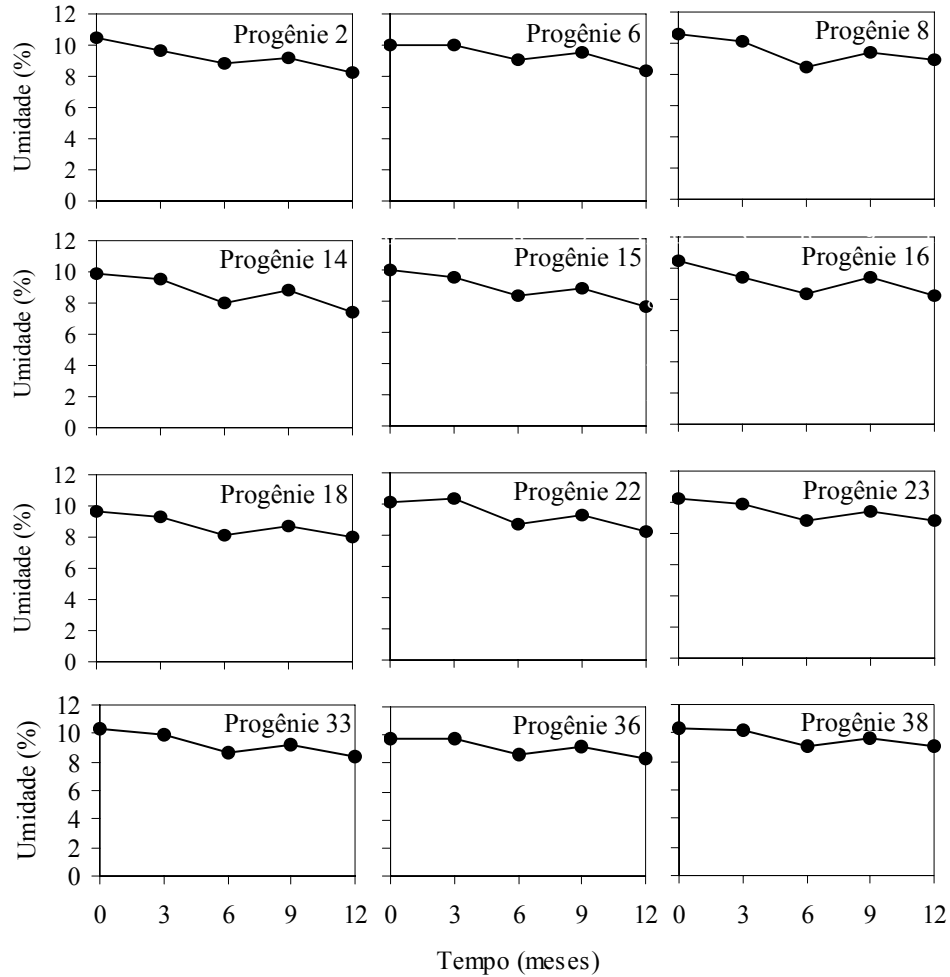


Figura 1. Grau de umidade (%) das sementes de doze progênies do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, durante 12 meses de armazenamento.

3.2. Vigor

Nas sementes com tegumento intacto e não armazenadas (0 meses), a progênie 22 apresentou maior germinação de suas sementes, atingindo valores de 65,0% (Figura 2A). As demais progênies apresentaram baixa germinação, com valores inferiores a 28,0% e inclusive em algumas destas progênies (6; 8; 15 e 16), não houve germinação alguma. Quando se procedeu a escarificação no tegumento, novamente, foram as sementes da progênie 22, aquelas que mostraram-se mais vigorosas. O acréscimo na

germinação das sementes, ao escarificá-las, foi baixo e as progênies cujas sementes responderam a este tratamento foram as 6 (10,0%), 8 (11,5%); 15 (18,5%); 16 (14,5%); 22 (5,5%), 23 (2,0 %); 33 (12,5%) e 38 (9,5%). Nas demais progênies, a escarificação do tegumento reduziu a germinação. Não obstante, quando se empregou, como tratamento, o trincamento do tegumento, foi a progênie 23 a que apresentou a maior germinação das sementes, atingindo valores de 75,0%. Isso se traduziu em elevação 62,0 e 60,0% na germinação, se comparado às sementes intactas e escarificadas que não diferiram estatisticamente entre si. O aumento na germinação foi mais expressivo, quando as sementes foram trincadas, pois elevou a germinação das sementes de todas as progênies.

Aos 3 meses de armazenamento, as sementes com tegumento intacto da progênie 22 foram consideradas as que resultaram em maior porcentagem de germinação (84,0%) (Figura 2B). Essa germinação foi aumentada em 25%, quando se compara estas sementes com aquelas que não foram armazenadas (65,0%). Embora tenha sido considerada a progênie com sementes mais vigorosas, não foi observado ganho representativo ao promover tratamentos físicos no tegumento. Porém, as progênies 8, 14, 15 e 18 lograram ganhos consideráveis de 21,5; 29,0; 23,0 e 39,0%, respectivamente, quando as sementes foram escarificadas. Ao trincar o tegumento das sementes, a germinação aumentou em relação ao controle, aumentando também o número de progênies que mais se beneficiaram com esse tratamento (6 - 23,0%; 8 - 51,5%; 14 - 37,0%; 15 - 23,0%; 16 - 44,0%; 17 - 37,0%; 23 - 29,0% e 33 - 30,5%).

Aos 6 meses de armazenamento, altos índices de germinação foram obtidos com as progênies 15 (78,0%) e 23 (85,0%) (Figura 2C). E aos 9 meses, as progênies 2, 22, 23 e 36 atingiram valores de aproximadamente 50,0 % de germinação (Figura 2D).

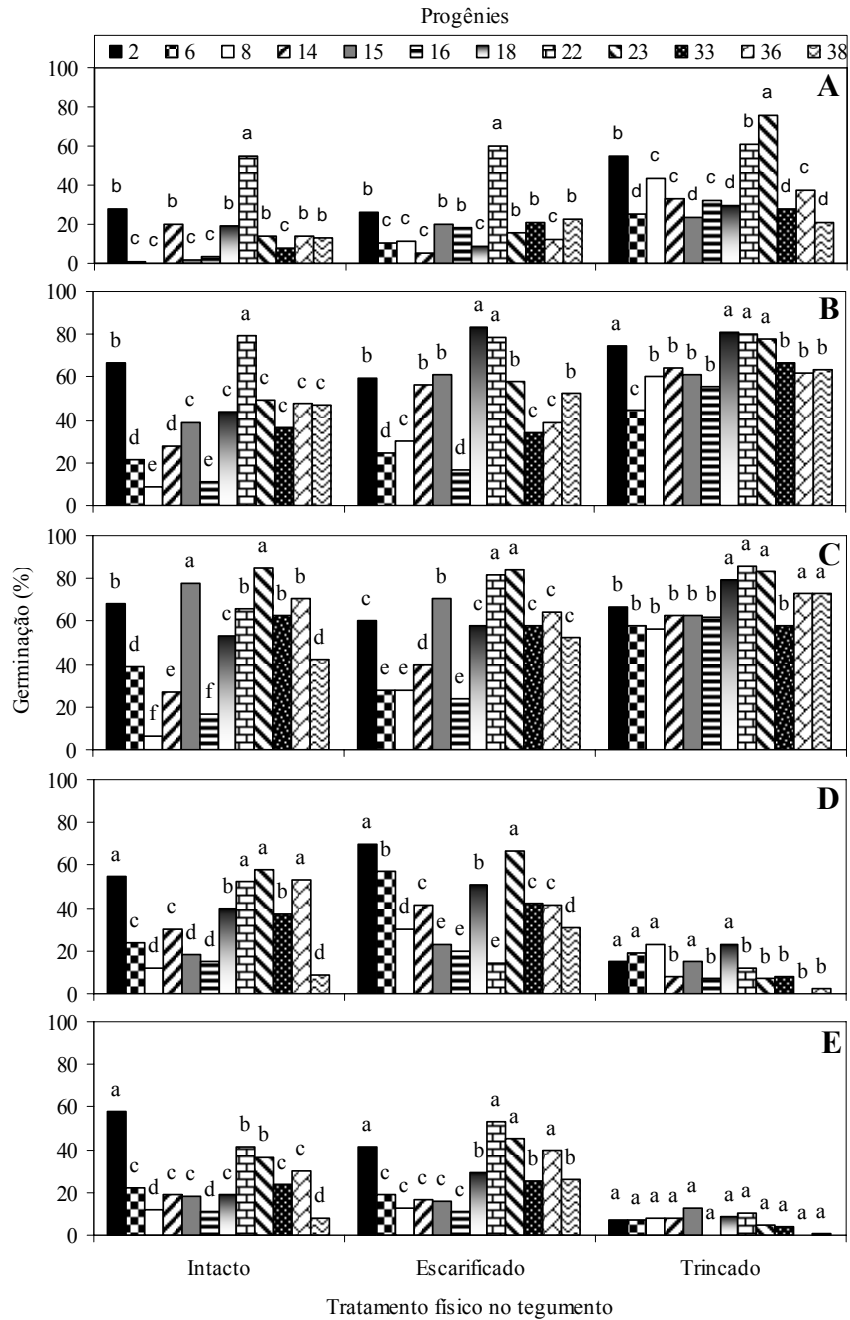


Figura 2. Vigor (%) de sementes de doze progênes do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento (A: 0 ; B: 3; C: 6; D: 9 e E: 12 meses). Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento físico no tegumento, entre as progênes, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Apenas a progênie 2, aos 12 meses de armazenamento, foi estatisticamente superior as demais, mostrando ser mais vigorosa (58,0%) (Figura 2E). Esta identificação é marcadamente importante para a caracterização de indivíduos que toleram mais ao processo de armazenamento. Observa-se também aos 12 meses de armazenamento, que a escarificação das sementes das progênies 18, 22, 23 e 36 resultou em pequeno aumento para esta característica (Figura 2E). Entretanto, neste período, o trincamento foi muito prejudicial ao processo germinativo em todas as progênies avaliadas.

A identificação das progênies 22 e 2, como sendo as mais vigorosas no tempo zero (Figura 2A) e aos 12 meses de armazenamento (Figura 2E), respectivamente, permitiu, com base na primeira contagem do teste de germinação, antecipar o reconhecimento de determinados indivíduos, quanto ao vigor das sementes. Esse teste fisiológico é de fundamental importância, por exemplo, para a propagação seminífera, no que diz respeito à produção de mudas destinadas a porta-enxertos originando, dessa forma, lotes uniformes e bem como para a manutenção de bancos de germoplasma.

Entre as progênies estudadas, verifica-se diferentes respostas quanto ao vigor e à germinação das sementes (Figuras 2 e 4). Entretanto, a capacidade germinativa das progênies não é influenciada apenas pela herança genética, cromossômica, extracromossômica, mas também pela movimentação de substâncias químicas, como inibidores de crescimento, dos tecidos maternos para as sementes em desenvolvimento (Cardoso, 2004). A transmissão de genes pode ser feita pela via não-nuclear ou maternal, por exemplo, em mitocôndrias e cloroplastos, como também por meio de tecidos da semente de origem materna, por exemplo a casca, testa e o pericarpo que podem afetar a germinabilidade das sementes (Foley & Fennimore, 1998).

Na Figura 3, observa-se que a germinação das sementes intactas se elevou em 58,33 e 25,0% das progênies, respectivamente com aumento no período de armazenamento até 6 e 9 meses. O maior vigor nas progênies 2 e 38 foi observado aos 3 meses, nas 2, 6, 15, 18, 23, 33 e 36, aos 6 meses e nas 8 e 14, aos 9 meses de armazenamento (Figura 3). Isto é indicativo de que as progênies requerem diferentes tempos de armazenamento para aumentar a germinação de suas sementes. Conforme relatado por Alexandre et al. (2004) essa diferença na germinação é causada pela genótipo.

A utilização de tratamentos físicos no tegumento das sementes, como a escarificação, elevou a germinação das sementes nas progêneses 8, 14 e 16 (até 9 meses) e 18, 22 e 38 (até 12 meses), em relação ao controle (Figura 3). Por outro lado, quando o tegumento das sementes foi trincado, o aumento foi apenas até o 6º mês de armazenamento, nas progêneses 6, 8, 14, 16, 18, 22, 36 e 38, em comparação ao controle.

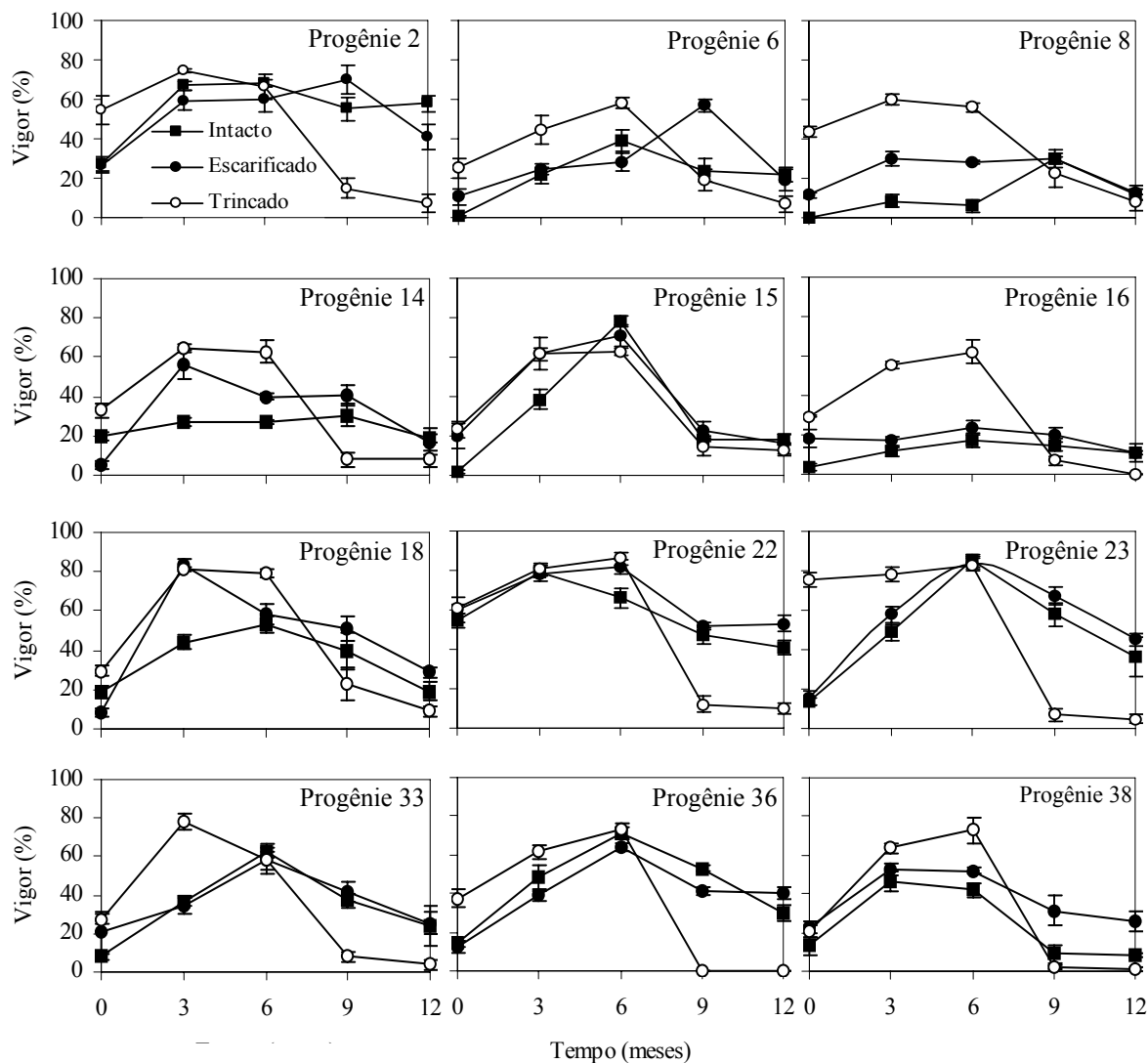


Figura 3. Germinação (%) primeira contagem de sementes de doze progêneses do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

3.3. Germinação

Independente do tratamento aplicado às sementes, a progênie 22 foi a que apresentou os maiores valores de germinação, até aos 6 meses de armazenamento (Figuras 4A, B e C). Para esta progênie, as sementes intactas, com 10,0% de umidade, apresentaram 65,5%; as escarificadas 72,5% e as trincadas 75,5% de germinação (Figura 4A). Quando se procedeu o trincamento do tegumento de suas sementes, não houve diferença estatística entre as progênies 2 (80,5%), 6 (69,5%), 23 (85,5%) e 33 (80,0%) (Figura 4A). Martins et al. (2005) obtiveram praticamente a mesma porcentagem de germinação (69,0%) em sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* com 10,0% de umidade. Segundo estes autores, a dessecação das sementes não afetou inicialmente sua qualidade fisiológica. Antes do armazenamento das sementes, verificou-se, neste trabalho, que a maioria das progênies requer tratamentos físicos no tegumento fato este observado, principalmente, ao trincar o tegumento, promovendo rachaduras nesta estrutura. O efeito de tratamentos físicos no tegumento das sementes das progênies elevou a germinação, principalmente quando este foi trincado (Figura 4A), revelando assim a barreira física imposta por esta estrutura. Segundo Morley-Bunker (1980), a dormência das sementes encontrada na família Passifloracea é considerada física, de ordem tegumentar, controlando a entrada de água para o interior da sementes.

Alexandre et al. (2004), ao estudarem a germinação de 24 genótipos do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* em casa de vegetação, observaram que a progênie 33 apresentou os melhores resultados de germinação (84,0%) e vigor das plântulas. Entretanto no presente trabalho, os melhores resultados de germinação de semente intacta (65,5%) e vigor foram encontrados na progênie 22, ao passo que a progênie 33 apresentou baixa germinação (10,0%) e vigor. Apesar das 12 progênies estudadas neste trabalho serem as mesmas avaliadas por Alexandre et al. (2004), esta diferença deve-se provavelmente a dois fatores distintos, ou seja, primeiramente a utilização de dois ambientes diferentes (casa de vegetação x câmara de germinação) que, neste caso, o fator limitante seria as condições ambientais e o segundo, ao tipo de substrato empregado (terra vermelha + areia, 1:1 v/v x rolo de papel).

Com 3 e 6 meses de armazenadas, as sementes da progênie 22, em todos os tratamentos físicos no tegumento, foram consideradas as que apresentaram o maior poder germinativo, com valores de 84,0% (intacto) e 85,0% (escarificado e trincado) aos 3 meses (Figura 4B) e 83,0% (intacto e escarificado) e 88,0% (trincado) aos 6 meses de armazenamento (Figura 4C). Esta progênie diferiu estatisticamente das demais, quando suas sementes permaneceram intactas, aos 3 meses de armazenamento (Figura 4B). Porém, aos 6 meses, não diferiu estatisticamente das progênies 15 (85,0%) e 23 (86,0%) (Figura 4C). A progênie 22, aos 3 meses de armazenamento, não diferiu estatisticamente da progênie 18 (85,0%), quando escarificadas, e das progênies 2 (77,0%), 18 (88,5%) e 23 (83,5%), quando trincadas (Figura 4B). Da mesma forma, aos 6 meses, não diferiu em relação as progênies 15 (78,0%) e 23 (85,0%), quando escarificadas e 2 (79,0%), 6 (88,0%), 18 (80,0%), 23 (83,0%), 36 (78,0%) e 38 (78,0%), quando trincadas (Figura 4C).

Aos 9 meses de armazenamento, as maiores porcentagens de germinação foram obtidas com as progênies 6 (88,0%), 22 (98,0%) e 33 (91,0%), não diferindo estatisticamente entre si. Valores altos de germinação também foram encontrados nas progênies 2, 14, 18, 23 e 36, variando entre 71,0 e 85,0%. Neste período, ficou bastante evidente o efeito negativo dos tratamentos físicos no tegumento, na metade das progênies avaliadas (16, 18, 22, 23, 33 e 36), quando estas foram escarificadas, e para todas as progênies, quando foram trincadas (Figura 4D).

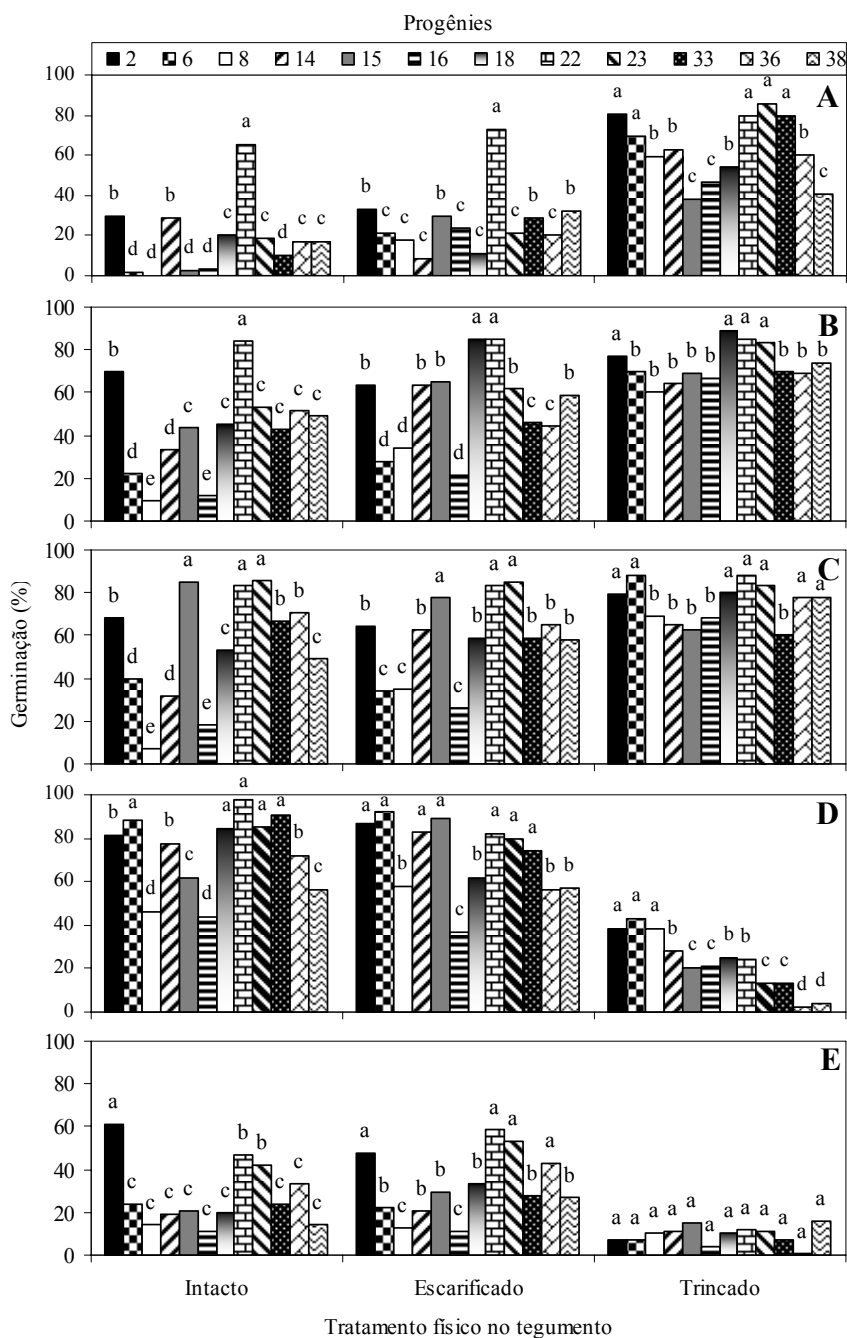


Figura 4. Germinação (%) de sementes de doze progênies do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento (A: 0 ; B: 3; C: 6; D: 9 e E: 12 meses). Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento físico no tegumento, entre as progênies, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Em todas as progênies que tiveram o tegumento das sementes trincado, aos 12 meses de armazenamento, a germinação foi inferior a 17,0%, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 4E). Entretanto, as progênies 2, 22, 23 e 36 responderam à escarificação, apresentando 48,0; 58,9; 53,0 e 43,0% de germinação, respectivamente. O mais importante foi identificar, dentre as doze progênies, aquela ou aquelas que apresentassem o melhor poder germinativo ao final de 12 meses de armazenamento. Nas condições estudadas, a progênie 2 alcançou a maior porcentagem de germinação (61,0%) das sementes com 8,0% de umidade e sem a necessidade de tratamentos físicos no tegumento das sementes (Figura 4E). Martins et al. (2005) verificaram que a conservação das sementes do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* é favorecida pela combinação do grau de umidade de 10,0% com a temperatura de armazenamento de 20 °C. Nesta condição obtiveram 81,5% de germinação após 315 dias de armazenamento. Esses autores verificaram também que nas sementes com 8,0% de umidade a germinação foi de 75,0%, diferença de 14,0% menos do obtido no presente trabalho. Não obstante, há que considerar a diferença de 50 dias no armazenamento (aproximadamente 2 meses) entre os dois trabalhos. Catunda et al. (2003) verificaram que a melhor forma para preservar o vigor das sementes após 10 meses de armazenamento seria acondicioná-las em embalagens permeáveis e mantê-las em refrigerador. Nesta condição, não houve diferenças entre os teores de 8 e 10% de umidade, apesar das sementes com 10% mostrarem pequena superioridade em relação às sementes com 8% de umidade, a partir do quarto mês de armazenamento. Fonseca & Silva (2005) também verificaram que a secagem não afetou o desempenho fisiológico das sementes dessa espécie antes do armazenamento, já que os valores de germinação e vigor não foram afetados. Os valores médios da germinação das sementes em função dos diferentes graus de umidade foram de 98,0% (31,3% U); 97,0% (26,8 e 20,9% U); 95,0% (16,6% U); 93,0% (10,8% U); 94,0% (7,3% U).

Verificou-se, com exceção da progênie 15, que as demais progênies aumentaram a porcentagem de germinação das sementes intactas, até 9 meses do armazenamento (Figura 5). Dentre estas, as que apresentaram germinação acima de 50,0% no tempo zero de armazenamento, foram as progênies 2 (51,0%), 6 (86,0%), 18 (64,0%), 23 (66,5%), 33 (81,0%) e 36 (55,0%).

Em comparação às sementes intactas, o processo de escarificação foi benéfico à germinação apenas da progênie 8 até 9 meses de armazenamento. O ganho em comparação às sementes intactas foi de 25,0% (aos 3 meses), 28,0% (aos 6 meses) e 12,0% (aos 9 meses) (Figura 5).

Antes do armazenamento, observou-se o efeito positivo do rompimento da estrutura tegumentar, quando as sementes de todas as progênies foram trincadas. (Figura 5). Entretanto, para as sementes armazenadas acima de 6 meses, este método não deve ser empregado, visto que aos 9 e 12 meses de armazenamento, reduziu marcadamente o processo germinativo para todas as progênies (Figura 5).

Segundo Almeida et al. (1988), os melhores resultados de germinação das sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram obtidos aos 70 e 77 dias de idade dos frutos nas condições de armazenamento em câmara seca e fria. Verificou-se ainda, que o armazenamento nestas condições foi benéfico para a germinação das sementes, concordando com o presente trabalho, no qual o aumento no tempo de armazenamento em câmara seca até 9 meses foi benéfico para todas as progênies, com exceção da progênie 15 (Figura 5). Becwer et al. (1983) já se referiam às sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* como ortodoxas, fato corroborado por Nakagawa (1991). Entretanto, o que provavelmente explica a perda do poder germinativo das sementes que tiveram o tegumento trincado após 12 meses de armazenamento, seria que, ao promover este processo mecânico, as células próximas ao embrião se encontrariam desorganizadas devido ao armazenamento, não mais atuando de forma protetiva, facilitando, assim, o efeito do dano diretamente ao embrião.

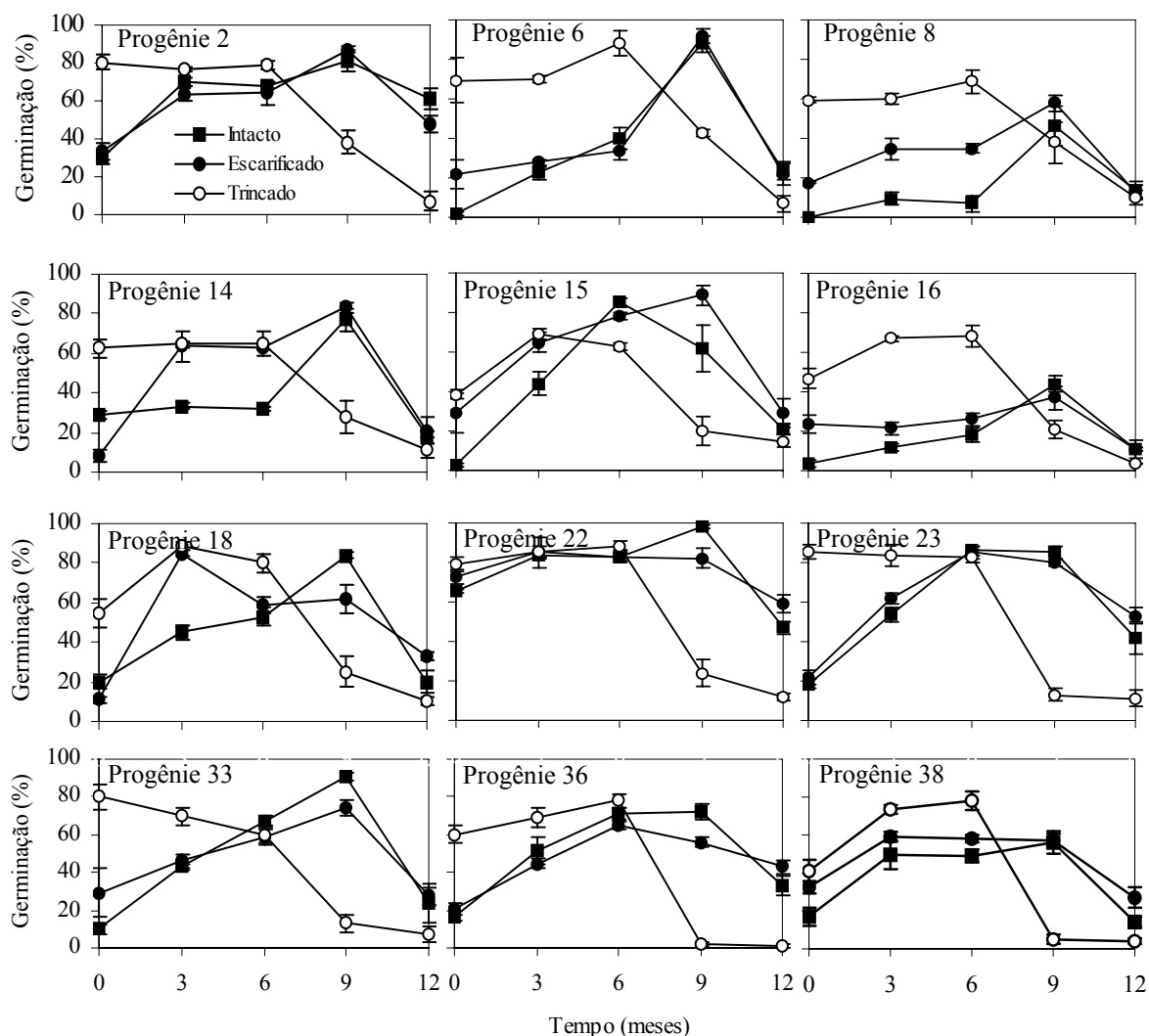


Figura 5. Germinação (%) de sementes de doze progênies do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, submetidas a tratamentos físicos no tegumento e ao armazenamento. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

3.4. Condutividade elétrica

As sementes das progênies 8, 14, 16 e 38 foram as que apresentaram maior valor de condutividade elétrica, aos doze meses de armazenamento (Figura 6). Esses maiores valores de condutividade elétrica foram referentes às progênies cuja germinação, ao final dos doze meses de armazenamento, foi inferior a 20,0%. O aumento do vazamento de

eletrólitos durante a germinação de sementes reflete a perda da integridade da membrana. Isto é indicativo de uma inabilidade para manter as membranas organizadas, resultando finalmente em perdas na germinação, conforme verificado com as progêneses acima mencionadas. A desestruturação dos sistemas de membranas a nível celular tem sido relatada como a consequência inicial da deterioração (Abdel Samad & Pearce, 1978).

Reações oxidativas são mediadoras do processo deteriorativo das sementes (Flood & Sinclair, 1981) por auto-oxidação ou peroxidação em processo não enzimático (Harrington, 1973). Entretanto, o envelhecimento das sementes pode ser mediado por reações oxidativas envolvendo enzimas como as lipoxigenases; e também a deterioração das sementes armazenadas pode ser induzida por processos enzimáticos (Pearce & Abdel Samad, 1980). A oxidação de ácidos graxos insaturados é considerada a primeira reação do processo de envelhecimento, produzindo radicais livres que atacam lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, com reações em cadeia (Harrington, 1973).

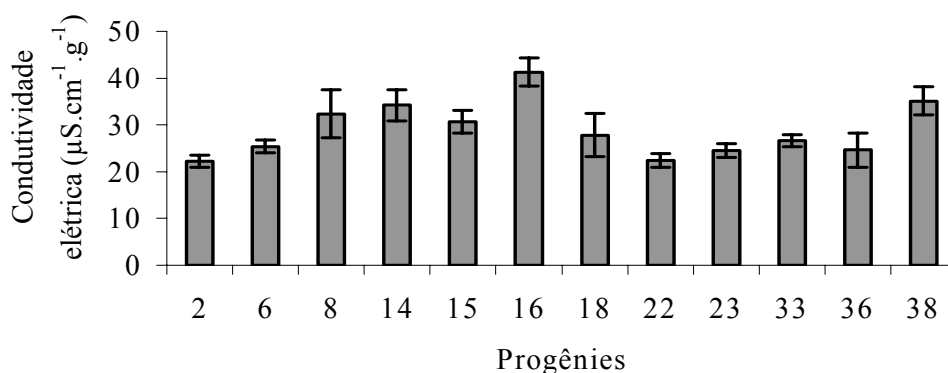


Figura 6. Condutividade elétrica em sementes de doze progêneses do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, aos doze meses de armazenamento. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

3.5. Peroxidação de lipídios

As sementes das progênes 6, 8, 14, 15, 16, 18 e 38 foram as que apresentaram maior concentração de malondialdeído (MDA), aos doze meses de armazenamento (Figura 7). O aumento na permeabilidade da membrana, promovido pelo estresse no armazenamento, corresponde bem com a peroxidação de lipídios, determinado pelo aumento na concentração de MDA. Estes dados apoiam a idéia de que a perda de viabilidade da semente está associada com o aumento da peroxidação de lipídios. A ativação de um sistema antioxidante é fundamental na regulação do metabolismo celular de forma a atuar como mecanismo protetor contra processos oxidativos que venham a promover danos à integridade da membrana.

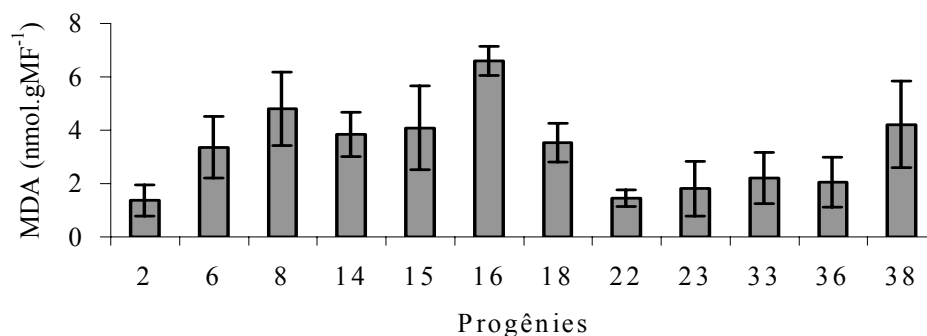


Figura 7. Peroxidação de lipídios (teor de MDA) em sementes de doze progênes do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, aos doze meses de armazenamento. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

O processo de dessecação, bem como outros estresses bióticos e abióticos, causam perdas em mecanismos de controle que mantêm baixas as concentrações de ROS (“espécies reativas do oxigênio”) (Kranner et al., 2002). O aumento em ERMO, conduz a processos deteriorativos com o envelhecimento e eventualmente à morte (Beckmann & Ames, 1998). ROS como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é menos reativo, tendo meia-vida de 2-4 μs , e baixa concentração celular ($<10^{-11}$ M) para causar peroxidação e ainda não pode ultrapassar as membranas biológicas (Vronová et al., 2002). O $O_2^{\cdot-}$ pode reagir

com outro radical superóxido, por meio de reação não-enzimática ou por reação enzimática (catalizada pela enzima superóxido dismutase, SOD), para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma vez formado, o H_2O_2 , pode dar origem ao radical hidroxila (OH^\cdot) catalisado pelo íon ferro, através da reação de Haber-Weiss (Kranter & Birtic, 2005). Esse radical hidroxila é considerado a ROS mais reativa, sendo que uma de suas características é a de iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Ferreira & Matusubara, 1997). Segundo Wilson & McDonald (1986), a peroxidação de lipídios promove a destruição de lipídios da membrana; co-oxidação de componentes celulares pela transferência de radicais livres no processo oxidativo; e também a formação de aldeídos citotóxicos. De acordo com esses autores, por exemplo, os radicais livres vão dar origem a hidroperóxidos, que podem sofrer desarranjos estruturais promovidos pela ação de calor, enzimas, citocromo, metais de transição e hidrogênio, e formar os aldeídos, que reagem com grupos sulfidril, conduzindo à inativação de proteínas e diminuição da atividade mitótica das células, por inibir uma importante proteína dos microtúbulos chamada tubulina, que é necessária para a formação do fuso mitótico.

3.6. Isoenzimas

3.6.1. Álcool desidrogenase (ADH)

As sementes das progênes 2, 22, 23, 33 e 36 foram as que apresentaram nos padrões izoenzimáticos revelados para álcool desidrogenase (ADH), maior coloração de bandas, se comparado aos das progênes 6, 8, 14, 15, 16, 18 e 38 (Figura 8).

Segundo Vantoi et al. (1987), à medida que ocorre redução na qualidade fisiológica das sementes, provavelmente reduz a concentração de ADH e, conseqüentemente, aumenta a concentração de acetaldeído.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoi et al., 1987). A produção de acetaldeído durante o armazenamento acelerou a deterioração das sementes de beterraba (Zhang et al., 1994)

3.6.2. Malato desidrogenase (MDH)

As sementes das progênies 6, 8, 14, 15, 16, 18, 33 e 38 foram as que apresentaram nos padrões izoenzimáticos revelados para malato desidrogenase (MDH), maior coloração de bandas, se comparado aos das progênies 2, 22, 23 e 33 (Figura 8).

A enzima malato desidrogenase é importante na respiração celular. A maior intensidade de coloração de bandas dessa enzima pode estar relacionada com o aumento da respiração que ocorre em sementes durante o processo deteriorativo avançado, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (Shatters et al., 1994).

A enzima malato desidrogenase catalisa a reação do malato à oxalacelato, tendo importante função no ciclo de Krebs, além de participar do transporte de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

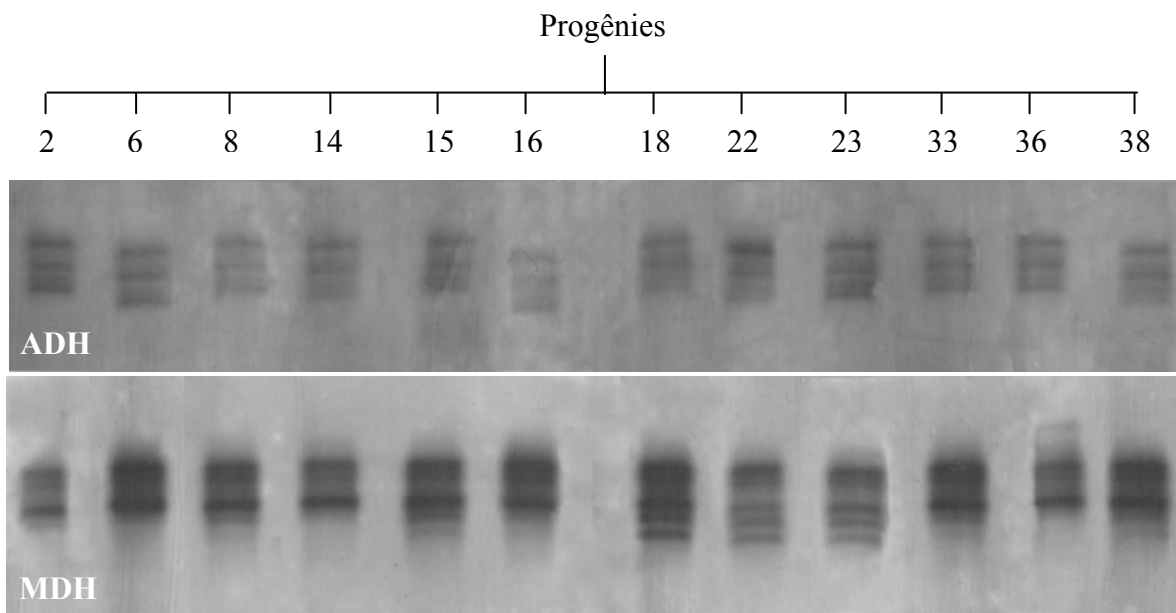


Figura 8. Padrões isoenzimáticos em sementes de doze progênies do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, revelados para álcool desidrogenase (ADH) e malato desidrogenase (MDH), aos doze meses de armazenamento.

4. CONCLUSÕES

- Há grande variabilidade genética dentre as progênies estudadas, quanto à qualidade fisiológica das sementes;
- Por meio do teste de vigor é possível antecipar o reconhecimento de indivíduos mais vigorosos;
- O armazenamento é benéfico para a germinação das sementes dessa espécie;
- O trincamento das sementes armazenadas é prejudicial à germinação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, A.M.; NAKAGAWA, J.; ALMEIDA, R.M. Efeito do armazenamento na germinação de sementes de maracujá amarelo de diferentes estádios de maturação. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura **Anais...** Campinas 9, p.603-608, 1988.

ARIMURA, C.T. **Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa:UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

BECKMANN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiology Review**, v.78, p.547-581, 1998.

BECWAR, M.R.; STANWOOD, P.C.; LEONHARDT, K.W. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and

desiccation-sensitive seeds. **Journal American Society Horticulture Science**, v.108, p.613-618, 1983.

BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; MYCOCK, D.J.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant (homoyidrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science & Technology**, v.18, p.297-310, 1990.

BORSOI FILHO, J.L. **Variabilidade isoenzimática e diversidade genética em seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa: UFV, 1995. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. Coordenação de Laboratório Vegetal. Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 365p, 1992.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

CARDOSO, V.J.M. Dormência: estabelecimento do processo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323p, 2004.

CATUNDA, P.H.A.; VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F. da; POSSE, S.C.P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.65-71, 2003.

CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B. **Starch gel eletroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkeley, USDA: Forest Service, 1982. 18p.

DHINDSA, R.S.; PLUMB-DHINDSA, P.; THORPE, T.A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased

levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, v.32, p.93-101, 1981.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica do Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLOOD, R.G.; SINCLAIR, A. Fatty acid analysis of seed permeable and impermeable seeds of *Trifolium subterraneum* (Subterranean clover). **Seed Science & Technology**, v.9, p.447-477, 1981.

FOLEY, M.E.; FENNIMORE, S.A. Genetic basis for seed dormancy. **Seed Science & Technology**, v.8, p.173-182, 1998.

FONSECA, S.C.L.; SILVA, W.R. Conservação de sementes de maracujá-amarelo: interferências no teor de água das sementes e da temperatura de armazenamento. **Bragantia**, v.64, n.2, p.273-289, 2005.

HARMAN, G.E.; MATTICK, L.R. Association of lipid peroxidation with seed aging and death. **Nature**, v.260, p.323-324, 1976.

HARRINGTON, J.F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science & Technology**, v.1, n.2, p.453-464, 1973.

HIDALGO, A.F.; TAVEIRA, M.B. Germinação de sementes de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* H.B.K.). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, **Resumos...** Curitiba 14, p.333, 1996.

KRANNER, I.; BECKETT, R.P.; WORNIK, S.; ZORN, M.; PFEIFHOFER, H.W. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **Plant Journal**, v.31, p.13-24, 2002.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, p.734-740, 2005.

KRYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I. Condutividade elétrica. **Informativo Abrates**, v.5, p.26-33, 2001.

KRYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato de testes de vigor disponíveis para grandes culturas. **Informativo Abrates**, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D.; AULAR, J. Growth and development of grenadilla plants. I. Morphology during the first phases of the growth cycle. **Fruits**, v.52, p.11-17, 1997.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.

MARTINS, L.; SILVA, W.R.; MELETTI, L.M. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, p.183-189, 2005.

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: Bruckner, C.H.; Picanço, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre, RS, Cinco Continentes, p.471, 2001.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. Seed coat dormancy in *Passiflora* species. **Annual Journal**, v.8, p.72-84, 1980.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. **Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp. and other tropical and subtropical crops**. Londres: University of London, 43p, 1974.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; AMARAL, W.A.N. Armazenamento de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.13, p.76-80, 1991.

PEARCE, R.S.; ABDEL SAMAD, I.M. Changes in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.31, p.1283-1290, 1980.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage, life of seeds. **Seed Science & Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: Roberts, E.H. **Viability of seeds**. London: Chapman & Hall, p.14-58, 1972.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.DEA.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L.DE. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo, Ceres, 1977.

VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; McDONALD JUNIOR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, v.102, n.1, p.33-39, 1987.

VRONOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1227-1236, 2002.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMAR, Y.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, v.4, p.49-56, 1994.

WILSON, D.O.JR.; MCDONALD, M.B.JR. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science & Technology**, v.14, p.269-300, 1986.

Efeito da benzilaminopurina (BAP) na organogênese *in vitro* e na absorção de nutrientes em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a morfogênese e absorção de nutrientes pelos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), cultivados *in vitro*, na presença ou ausência de BAP (experimento I) e submetidos previamente a imersão em meio de MS líquido contendo 0,7 mg L⁻¹ de BAP (experimento II). Os segmentos de hipocótilo foram cultivados na ausência ou presença de BAP (experimento I) e imersos em meio MS líquido com 0,7 mg L⁻¹ de BAP (experimento II), onde permaneceram sob agitação a 60 rpm em agitador orbital em tempos de 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Em seguida foram plantados verticalmente em meio MS sólido isento de regulador de crescimento. No experimento I, verificou-se que o BAP está relacionado com a formação de maior número de gemas, em detrimento da formação e alongamento de brotos. Nesse experimento, a presença de BAP inibiu por completo a rizogênese. Além disso, esta citocinina influenciou negativamente a absorção de nutrientes. E no experimento II, a exposição dos explantes por 36 horas ao BAP foi a que resultou no maior número de gemas formadas. A não imersão dos explantes no BAP, além de ter permitido a formação de brotos, foi a condição que proporcionou o maior desenvolvimento destes. A imersão prévia dos segmentos hipocotiledonares em BAP não inibiu a rizogênese, independentemente do tempo dessa imersão. Houve formação de uma única raiz por explante, sendo pouco desenvolvida.

1. INTRODUÇÃO

Entre os reguladores de crescimento, o BAP (6-benzilaminopurina) parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea, indução de gemas adventícias e formação de brotos (Grattaplaglia & Machado, 1998) e é a mais utilizada na cultura de tecidos, pois induz maior atividade morfogênica, se comparado à zeatina e à cinetina (Marino & Bertazza, 1990).

Na literatura revisada, existem trabalhos nos quais se investigaram a resposta de diferentes concentrações de BAP no cultivo *in vitro* de distintas espécies de maracujazeiros. Dentre estes, o trabalho desenvolvido por Couceiro (2002) mostrou que o cultivo de segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* na orientação vertical em meio MS, contendo 0,7 mg L⁻¹ de BAP, foi a condição que auferiu maior êxito quanto à resposta morfogênica. Entretanto, verificou-se neste e em outros trabalhos, como o de Alexandre (2002) e Bento et al. (2004), formação de numerosas gemas, porém com poucas delas alcançando a categoria de brotos. Alexandre (2002) e Felismino (2005) observaram que as folhas dos brotos formados tornavam-se acentuadamente cloróticas e, em alguns casos, quase brancas, sendo esta a possível razão das brotações lograrem reduzido alongamento, impróprio para o transplante e aclimatização.

Kantharajah & Dodd (1990) observaram que a permanência de explantes nodais de *P. edulis* no meio MS contendo BAP, por períodos de tempo superiores a quatro semanas, resultou em baixa resposta organogênica e os brotos formados tornavam-se cloróticos e eventualmente morriam. Esses autores explicam tal anomalia como sendo consequência de uma possível toxidez resultante do acúmulo de BAP no tecido dos explantes. Essa clorose em tecidos de *P. edulis* f. *flavicarpa* *in vitro* é descrita como sério problema para o desenvolvimento das estruturas organogênicas (Alexandre, 2002; Couceiro, 2002; Felismino, 2005). Em outras espécies, como urucuzeiro, morangueiro e videira, também, se têm verificado clorose nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* (Rodríguez Ortíz, 2004; Barbosa, 2006), e esse sintoma foi atribuído às citocininas. Pitman (1977) aponta o ácido abscísico e citocininas, como sendo fitoinibidores do fluxo de íons do citoplasma para o xilema.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfogênica de segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* submetidos a diferentes tempos de imersão em BAP e seu efeito na absorção de nutrientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas

As sementes foram extraídas de frutos maduros e colhidos de uma única planta de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, procedente do pomar do Setor de Fruticultura, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em condições laboratoriais e mediante o uso de uma peneira de malha fina, o arilo das sementes foi removido, pressionando-as cuidadosamente, depois de envolvê-las em cal extinta. Em seguida, as sementes foram lavadas em água de torneira até completa remoção da cal e restos placentários. Posteriormente, foram submetidas à secagem à sombra, sobre papel toalha, por três dias. Após o processo de secagem, procedeu-se o preparo das sementes. Com auxílio de uma mini-morsa, realizou-se a remoção por completo do tegumento externo (episperma).

As sementes, sem o episperma, foram desinfestadas sob condições de câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foram submetidas por 1 minuto em solução de etanol a 70% (v/v), seguido de três enxaguaduras e, logo após, imersas em solução de hipoclorito de sódio com 2,4% de cloro ativo do produto comercial Candura[®] durante 20 minutos e, posteriormente, enxaguadas por três vezes em tempos de 1 minuto, sob agitação constante, em água desionizada e autoclavada.

O meio de cultivo das sementes foi constituído dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White (1951), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8,0 g L⁻¹ de ágar (Isifar[®]), como agente solidificante. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar. Alíquotas de 10 mL deste meio foram distribuídas por tubo de ensaio (25 x 150 mm). Os tubos, contendo o meio foram fechados com tampas de propileno transparentes e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,05 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

As sementes foram semeadas no meio de cultivo, uma por tubo de ensaio. Após o semeio, os tubos foram fechados como já descrito anteriormente, acondicionados em grades que foram envolvidas com papel alumínio e transferidos para a sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente 60%. O papel alumínio foi utilizado para proteger as sementes contra luz, já que são classificadas, como fotoblásticas negativas por Maciel & Bautista (1997).

O período de incubação foi de 12 dias, tempo suficiente para obter as plântulas axênicas, com hipocótilo de 10 cm de comprimento e 1,3-1,5 mm de diâmetro.

2.2. Fase de cultivo dos segmentos de hipocótilo

Obtidas as plântulas axênicas por meio da germinação *in vitro*, estas foram excisadas separando de cada plântula 5 segmentos de hipocótilo de aproximadamente 1,0 cm de comprimento. O trabalho foi dividido em dois experimentos.

No primeiro experimento, os segmentos de hipocótilo foram cultivados na ausência ou presença de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

No segundo experimento, os segmentos de hipocótilo, após sua individualização, tiveram o extremo proximal (mais próximo ao sistema radicular) cortado em bisel simples, de forma a identificar a polaridade do segmento. Em ato contínuo, os explantes eram preparados e deixados em repouso dentro de uma placa de Petri contendo água desionizada e autoclavada, de forma a conservá-los túrgidos. Após preparar os 50 segmentos que constituíram cada tratamento, estes foram introduzidos em Erlemeyer de 25 mL, contendo 8 mL do meio MS (apresenta a mesma constituição mineral e modo de preparo já descrito para a semente) líquido, contendo $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Estes segmentos permaneceram sob agitação de 60 rpm em agitador orbital, na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, no escuro, por tempos de 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas.

Após os tempos de imersão em BAP, os segmentos de hipocótilo, em número de 5, foram plantados em frascos de cultivo com capacidade volumétrica de 320 mL, altura de 12,5 cm, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm, contendo aproximadamente 30 mL de meio MS, na orientação vertical, introduzindo a região cortada em bisel no meio

MS descrito para a imersão dos explantes, porém solidificado com 8 g L⁻¹ de agar (Isofar[®]) e isento de regulador de crescimento.

Na sala de crescimento, os frascos contendo os segmentos de hipocótilo permaneceram incubados por 42 dias, à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de 30 ± 5 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes OSRAM[®], com potência de 40 W, luz do dia.

2.3. Características avaliadas

No experimento I, foram avaliados o número de gemas, brotos, raízes, comprimento de brotos, raízes e teores de macro e micronutrientes na parte aérea, calo e raízes. E no experimento II, o número de gemas, brotos, raízes, comprimento de brotos e raízes.

2.4. Delineamento experimental

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. O experimento I foi constituído de apenas dois tratamentos, ou seja, ausência e presença de BAP. No experimento II, os tratamentos foram os tempos de imersão (0; 1; 6; 12; 24; 36; 48 e 72 horas) dos segmentos de hipocótilo em BAP.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento I

Na Figura 1A, observa-se que em meio de cultivo contendo BAP, a formação de gemas foi maior (8,0), se comparado ao meio sem a citocinina (4,8). A presença de BAP (0,7 mg L⁻¹), no meio de cultura, estimulou os segmentos de hipocótilo do maracujazeiro a produzirem 60,0% a mais de gemas, em relação ao meio com ausência desta citocinina.

Entretanto, independentemente da presença ou da ausência do BAP no meio de cultivo, a formação de brotos foi a mesma (Figura 1B). Todavia, o comprimento destes

em meio sem a citocinina foi acima do dobro (8,7 mm), comparado ao meio contendo a citocinina (4,0 mm) (Figura 1C).

Nas Figuras 2A e B, observa-se a formação e o crescimento de raízes em meio de cultivo com ausência de BAP. Em meio de cultivo contendo esta citocinina, o processo rizogênico foi completamente inibido, dando lugar à formação de calos compactos e de grande tamanho (Figura 3A).

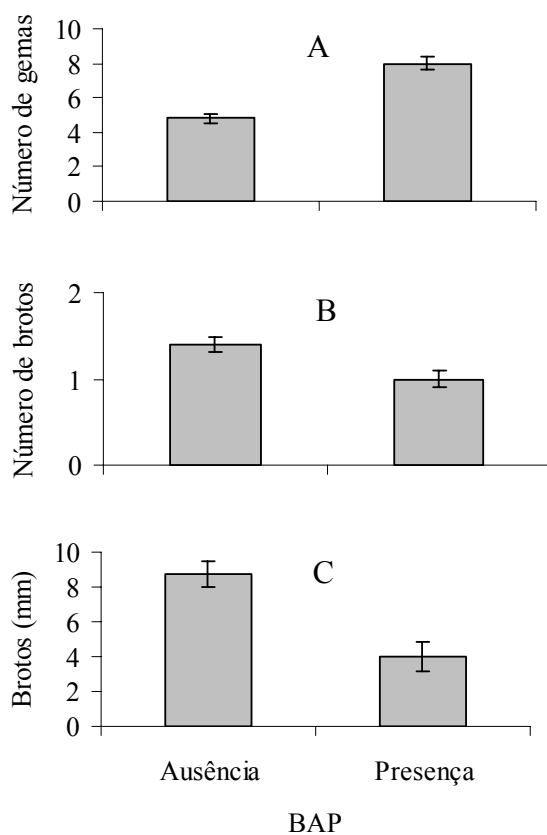


Figura 1. Influência da ausência ou presença de BAP ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$) na formação de gemas (A), brotos (B) e comprimento de brotos (C) do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

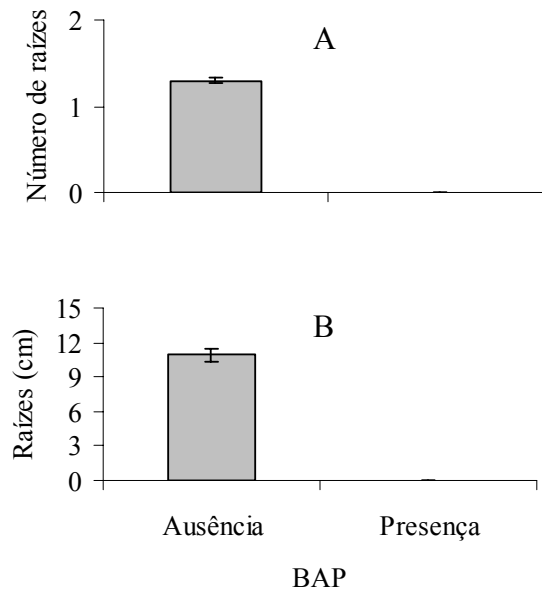


Figura 2. Influência da ausência ou presença de BAP (0,7 mg L⁻¹) na formação (A) e no comprimento médio de raízes (B) do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

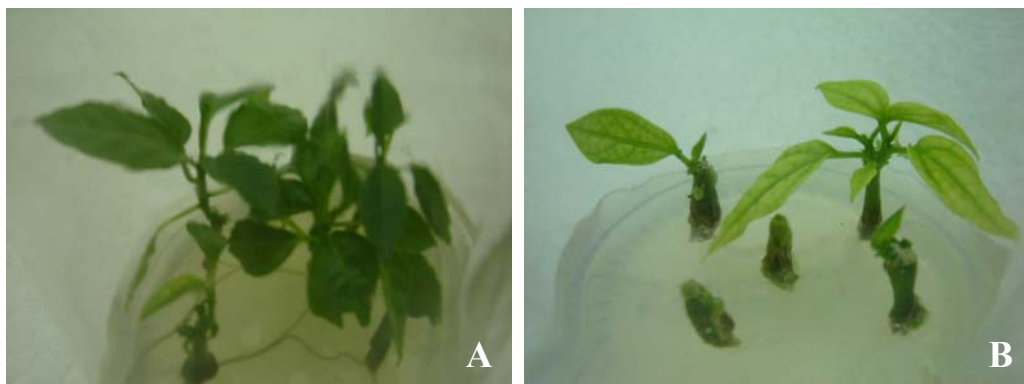


Figura 3. Efeito do BAP no aparecimento de clorose internerval, sintomas de deficiência mineral em folhas de plantas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. (A) ausência de BAP; (B) presença de BAP (0,7 mg L⁻¹) no meio de cultivo.

Nas análises, foi verificado efeito significativo do BAP no teor de nutrientes nas diferentes partes da planta. Na parte aérea, maior acúmulo de macro e micronutrientes ocorreu quando as plantas foram cultivadas em meio com ausência de BAP. Na presença deste fitorregulador, as plantas apresentaram menor acúmulo na parte aérea, principalmente de N, P, S, B, Cu, Fe e Zn (Tabela 1). Isto pode ser percebido na Figura 3B, pelo sintoma característico de clorose nas folhas, que está relacionado com a deficiência principalmente de N, Fe e Zn.

Como já mencionado anteriormente, raízes se formaram somente na ausência de BAP no meio de cultivo; e pela Tabela 1, pode-se observar que o acúmulo de macro e micronutrientes nas raízes seguem o mesmo padrão da parte aérea, porém apresentando, no geral, níveis ligeiramente menores. Considerando-se a planta como um todo, o acúmulo de macro e micronutrientes foi maior nos tecidos daquelas cultivadas na ausência de BAP, se comparado às cultivadas em meio com 0,7 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 1. Teores de macro e micronutrientes na parte aérea, calos e raízes de plantas de maracujazeiro cultivadas *in vitro* na ausência ou presença de BAP (0,7 mg L⁻¹).

Minerais	Teores nutricionais em diferentes posições na planta			
	Ausência de BAP		Presença de BAP	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Calo
Macronutrientes	(g kg⁻¹)		(g kg⁻¹)	
Nitrogênio (N)	55,36 A	52,61 A	43,98 B	42,19 B
Fósforo (P)	6,78 A	6,18 A	4,62 B	5,13 AB
Potássio (K)	59,62 A	57,02 AB	53,75 B	45,93 C
Cálcio (Ca)	5,90 A	5,23 A	5,93 A	5,64 A
Magnésio (Mg)	2,29 A	1,74 A	1,82 A	1,64 A
Enxofre (S)	3,19 A	3,19 A	2,45 B	2,36 B
Micronutrientes	(mg kg⁻¹)		(mg kg⁻¹)	
Boro (B)	47,37 A	23,25 BC	21,25 C	26,87 B
Cobre (Cu)	6,30 A	5,07 AB	3,37 C	4,87 B
Ferro (Fé)	141,18 A	113,52 AB	118,47 AB	103,75 B
Manganês (Mn)	146,90 AB	163,57 A	136,78 B	109,79 C
Zinco (Zn)	35,70 A	25,65 AB	19,55 B	19,60 B

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2. Experimento II

Houve acréscimo no número de gemas com o aumento no tempo de imersão dos segmentos de hipocótilo em BAP, atingindo a maior emissão (10,7) com 36 h de imersão dos explantes. Após esse tempo, observou-se queda no número de gemas formadas, com menor produção de gemas verificada com a imersão dos explantes por 72 h (Figura 4A).

Todavia, a maior emissão de gemas nos tempos de imersão de 6, 12, 24, 36 e 48 h não se traduziu em formação de brotos, visto que nos tempos de imersão de 1 a 48 h no BAP ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$) ocorreu inibição do processo de formação e o crescimento dos brotos (Figura 4B e C, respectivamente). Como no processo organogênico é importante haver equilíbrio entre o número de gemas que se formam e o número delas que resulta na formação e crescimento de brotos, os tratamentos com 0 e 72 h de imersão em BAP foram os mais eficientes (Figura 4C).

Nos maiores tempos de exposição ao BAP (48 e 72 horas), nos quais houve expansão das folhas, foram verificados sintomas de clorose (Figura 5). O mesmo, não foi verificado quando os segmentos de hipocótilo foram cultivados em meio com ausência da citocinina, no qual, inclusive, observou-se folhas com coloração verde intensa (Figura 5).

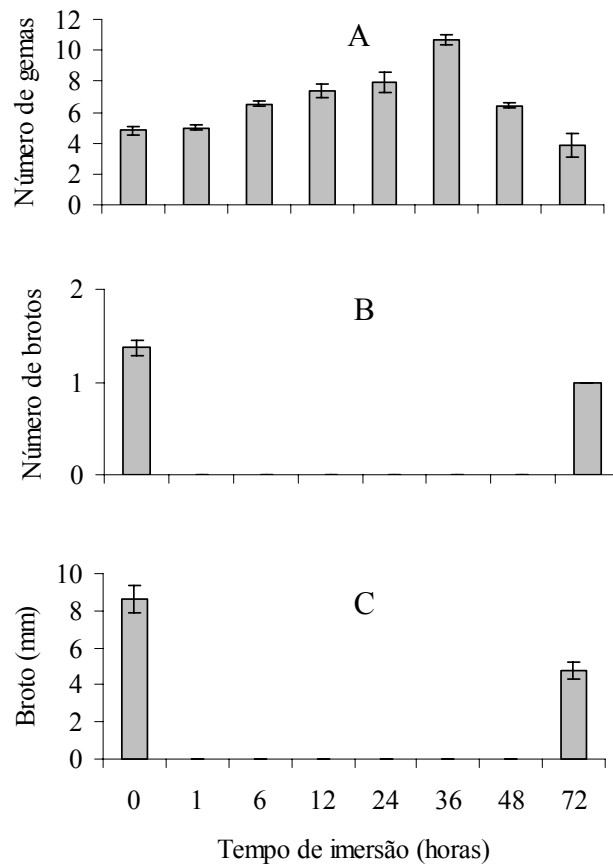


Figura 4. Influência do tempo de imersão em BAP na formação de gemas (A), brotos (B) e no comprimento de brotos (C) de *P. edulis* f. *flavicarpa*. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

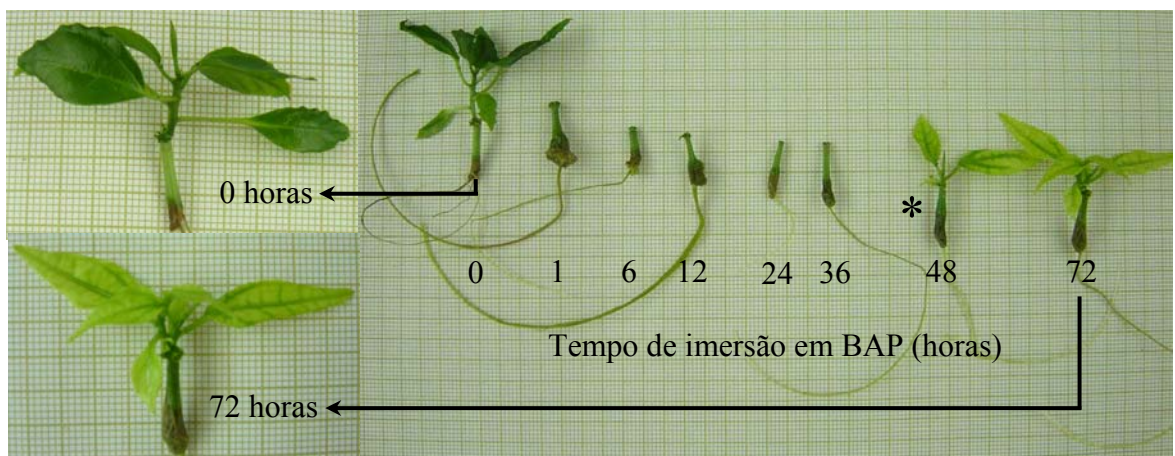


Figura 5. Influência do tempo de imersão em BAP na formação de brotos do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*.

O tempo de imersão em BAP não afetou o número de raízes formadas no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro. Em todos os tempos de imersão, o processo rizogênico foi desencadeado, formando, porém, uma única raiz por explante, inclusive nos segmentos de hipocótilo que não foram tratados com a citocinina (Figuras 5 e 6A). Com relação ao comprimento de raízes, maiores valores ocorreram nos menores tempos de imersão (até 12 horas) e com especial relevo para quando os segmentos de hipocótilo não tiveram contato com a citocinina (Figuras 5 e 6B).

É interessante verificar que a presença permanente dos segmentos hipocotiledonares em contato com o BAP (experimento I) inibiu por completo a rizogênese, enquanto que o contato destes explantes por tempos curtos de imersão seguido do plantio dos mesmos em meio desprovido de BAP, não inibiu o processo rizogênico, embora a única raiz formada tenha alcançado pequeno desenvolvimento.

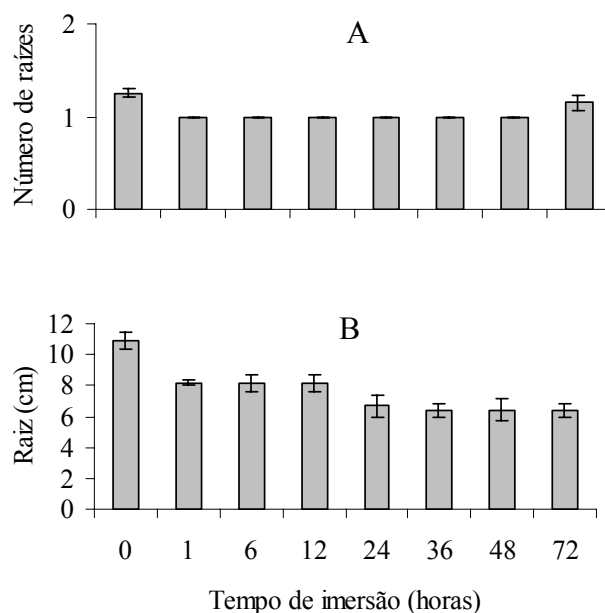


Figura 6. Influência do tempo de imersão em BAP na formação (A) e comprimento de raízes (B) do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

4. DISCUSSÃO

A presença de BAP no meio de cultivo mostrou beneficiar diretamente o número de gemas formadas por explante (Figura 1A), porém não a formação e alongamento de brotos (Figuras 1B e C, respectivamente). Vários trabalhos relatam que na espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, há grande produção de gemas por explante, e que poucas dessas evoluem a brotos (Alexandre, 2002; Couceiro, 2002; Bento et al., 2004; Felismino, 2005). Segundo Appezzato-da-Glória et al. (2005) e Felismino (2005), o processo organogênico em *P. edulis* f. *flavicarpa* é assincrônico, isto é, gemas, estruturas foliares e protuberâncias podem ser observadas em diferentes etapas de desenvolvimento no mesmo explante. Appezzato-da-Glória et al. (2005) relatam que isso é motivo de preocupação, já que observaram grande determinação dos explantes para a formação de primórdios foliares ao invés de gemas caulinares. No presente trabalho, ficou bastante claro que as folhas se formam em brotos e que muitas delas se expandem de modo apreciável. Embora, quando os explantes foram cultivados em meio com BAP (Figura 5), houve formação de grande número de gemas, apenas uma delas evoluiu para broto (Figura 1B), de reduzido tamanho (4,0 mm, Figura 1C).

A não formação de raízes no extremo proximal dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivados na presença de BAP (Figura 2A) pode ter contribuído para a menor absorção de nutrientes minerais e isso ter proporcionado o aparecimento de clorose internerval, representando sintomas de deficiência mineral nas folhas das plantas (Figura 3B). Felismino (2005) observou no extremo proximal dos segmentos hipocotiledonares, cultivados sob $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, uma fina camada cicatricial, constituída de células pequenas; e que esses explantes permitiram uma maior formação de calos em ambos os extremos (proximal e distal) se comparado àqueles que não tiveram contato com essa citocinina.

Monteiro-Hara et al. (2000), ao estudarem o efeito da composição mineral do meio de cultivo na propagação *in vitro* do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, encontraram nas folhas desta espécie maiores níveis de Ca, Mg, Cu e principalmente de Fe, quando os explantes foram cultivados em meio MS modificado (MSM, que contém 62,0% de P; 54,0% de Ca; 60,0% de Mg; 59,0% de S; 50,0% de Fe; 43,0% de Mn;

1,89% de Ca e 50,0% de Na, a mais e 85,0% de N; 84,8% de K; 33,0% de Zn e 70,0% de B, a menos que o meio MS), se comparado ao meio MS. Entretanto, no presente trabalho, o teor de Fe ($118,47 \text{ mg kg}^{-1}$) encontrado na parte aérea das plantas cultivadas no meio MS com presença de BAP foi praticamente o dobro do observado por aqueles autores, que foi de 62 mg kg^{-1} . Se se descartar a possibilidade da influência do meio MS, na carência de determinados nutrientes minerais nas plantas, possivelmente poderia atribuir-se esta diferença à concentração de BAP utilizada, a qual no trabalho de Monteiro-Hara et al. (2000) foi de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e no presente trabalho de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, a maior concentração de BAP ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) empregada por Monteiro-Hara et al. (2000) parece ter influenciado negativamente a absorção de Fe e de outros nutrientes, confirmado pela menor concentração desse elemento na parte aérea das plantas. Os explantes cultivados em meio sem a presença da citocinina, apresentaram maior conteúdo de Fe ($141,18 \text{ mg kg}^{-1}$) na parte aérea (Tabela 1). Em estudos anatômicos desenvolvidos por Morales Abanto & Muller (1997) em folhas de *P. edulis* Sims, deficientes em Fe, verificaram que o mesófilo apresentava poucos cloroplastos, de tamanho reduzido e localizados na parte externa das células cloroplastídicas. Segundo Taiz & Zeiger (2004), um sintoma característico da deficiência de Fe é a clorose internerval e, as folhas tornam-se cloróticas porque o Fe é necessário para a síntese de alguns dos complexos clorofila-proteína nos cloroplastos, além de ser muito importante como componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, como os citocromos.

Outro elemento mineral extremamente importante para a planta é o Zinco (Zn). No presente trabalho, nos segmentos hipocotiledonares cultivados em meio com ausência de BAP, o Zn foi encontrado em quantidades quase que o dobro ($35,7 \text{ mg kg}^{-1}$), do observado em plantas cultivadas em meio com presença de BAP ($19,6 \text{ mg kg}^{-1}$) (Tabela 1). Morales Abanto & Muller (1977) constataram, em plantas de *P. edulis* deficientes em Zn, na porção inferior do caule, estrangulamento dos elementos do xilema primário; e nas folhas, no mesófilo, muitos dos cloroplastos mostraram-se parcialmente fragmentados. Segundo Taiz & Zeiger (2004), esse elemento pode ser exigido para a síntese de clorofila e auxinas. Como esse nutriente é requerido para a síntese de auxinas, e a auxina natural é o ácido indolacético (AIA), cuja principal função

é promover o relaxamento da parede celular que governa a absorção de água e o alongamento celular, esse maior conteúdo de Zn, encontrado na parte aérea de plantas cultivadas em meio sem o BAP (Tabela 1), pode ser a explicação para o maior crescimento de brotos (Figura 3C), onde tal elemento, provavelmente estimulou a síntese de AIA, que promoveu o alongamento destes. Segundo Taiz & Zeiger (2004) outra grande importância da auxina é a de induzir a diferenciação vascular, por exemplo, as quantidades relativas de xilema e floema formados são reguladas por auxinas. Este fato é motivo de relacionarmos altas concentrações de Zn com o aumento dos níveis de AIA e, dessa forma, tem-se maior xilogênese e, conseqüentemente, maior capacidade de absorção de nutrientes, conforme foi observado nos segmentos hipocotiledonares cultivados na ausência de BAP (Tabela 1).

Para os demais nutrientes, houve pouca variação média entre os resultados dos dois estudos, inclusive Ca, Mg e Cu. Nos estudos sobre organogênese *in vitro* do maracujazeiro *P. edulis f. flavicarpa*, tem-se observado que o uso desta citocinina tem promovido formação intensa de calo na base dos explantes hipocotiledonares, cultivados principalmente na orientação vertical. Esta divisão desorganizada dos tecidos na região proximal dos explantes pode interferir na absorção dos nutrientes. Segundo Sugiyama & Komamine (1990), a adição de citocinina e/ou auxina ao meio de cultura promove a transdiferenciação de células parenquimáticas em elementos traqueais. De acordo com Scatena & Nunes (1996), esses elementos traqueais apresentam paredes espessas e lignificadas, estando associadas à retenção de água e ao suporte mecânico.

Vidor et al. (1999) observaram que a maior parte do BAP adicionado ao meio de cultivo foi absorvido nas primeiras 36 horas de cultivo dos explantes de *Hyacinthus amethystina* cv. Albus (jacinto pirenárico). Esses autores verificaram que a resposta morfogênica para os explantes desta espécie está diretamente relacionada com a orientação desses explantes no meio de cultivo, com o metabolismo do regulador de crescimento e conteúdo de supostas formas ativas de BAP (BA e [9R] BA). O exposto acima pelos autores, no referente ao tempo de absorção do BAP, pode ser a explicação do encontrado no presente trabalho, onde também, o maior número de gemas formadas ocorreu, quando o tempo de imersão dos explantes em BAP foi de 36 horas (Figura 4A). Isto, possivelmente, está relacionado com a maior absorção da citocinina. No presente

trabalho, provavelmente a exposição dos segmentos de hipocótilo por mais de 36 horas (48 e 72 h) resultou em bloqueio no processo de divisão celular, interrompendo, assim, a formação de áreas meristemáticas, que culminam em grupos de células meristemáticas, formando os meristemóides, estando isto de acordo com Appezzato-da-Glória et al. 2005; Felismino, 2005). Conforme mencionado pelos autores acima, isto explica o porque dos explantes imersos por 72 h em BAP terem originado um broto por segmento hipocotiledonar. O fato desse maior tempo de exposição ter promovido menor emissão de gemas contribuiu para que estas não competissem entre si e, dentre aquelas que se formaram, alguma se alongasse, evoluindo a broto (Figura 4B).

A clorose verificada nos tecidos expostos por maiores tempos de exposição ao BAP (Figura 5) pode estar relacionada com sintomas de toxidez, promovido pelo acúmulo de BAP nos tecidos (Kantharajah & Dodd, 1990). Este acúmulo pode ter estimulado a produção de etileno nos frascos de cultivo, segundo Reis (2003) e Alexandre (2006). Rodriguez Ortiz (2004), ao cultivar epicótilos de urucuzeiro em meio de cultivo provido de zeatina, observou redução nos teores de pigmentos cloroplastídicos em quaisquer que fossem as densidades de fluxo de luz empregadas. Segundo a autora, a explicação para o ocorrido seria que a citocinina não estimulou a rizogênese, o que pode ter comprometido a translocação de nutrientes e sua partição, além de ter havido proliferação de calo na extremidade proximal dos explantes. Isto certamente poderia ter causado os sintomas de clorose nos tecidos. Felismino (2005) observou grande proliferação de calos no extremo proximal dos explantes, e isto se deveu a maior atividade mitótica, que culminou em uma região com maior proliferação celular, sendo, por isso, mais desenvolvida. No presente trabalho, foi verificado na região proximal dos explantes, em contato com o meio de cultivo, uma camada cicatricial, conforme descrito por Felismino (2005) em explantes cultivados na orientação vertical normal que não formaram calos. Essas duas características morfológicas, formação de calos e tecido cicatricial, podem, por exemplo, constituir uma barreira física à absorção de nutrientes. Segundo Pitman (1977), os fitorreguladores ácido abscísico e citocininas atuam como inibidores do fluxo de íons do citoplasma para o xilema, e isto pode ser uma das explicações da clorose em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Segundo Barbosa (2006), durante o desenvolvimento *in vitro* das variedades ‘Dover’ e

‘Burkley’ de morangueiro (*Fragraria x ananassa*) e da videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*) ‘VR 043-43’, o aumento na concentração de BAP conduziu ao desenvolvimento de hiperidricidade, resultando em tecidos com drástica redução no conteúdo de clorofila.

No presente trabalho, apesar dos tempos em que os segmentos hipocotiledonares ficaram imersos em BAP, este não inibiu a emissão de raízes. O crescimento destas foi influenciado por esse fitorregulador, e isto mostra o efeito negativo do BAP no desenvolvimento dessa estrutura, principalmente quando o tecido fica mais tempo exposto a este regulador de crescimento (Figuras 5 e 6B). Faria & Segura (1997) verificaram em Passifloráceas que o uso de citocininas no meio de cultivo proporciona efeito residual, afetando a capacidade rizogênica dos explantes, mesmo sendo juvenis. No presente trabalho e nos trabalhos de Alexandre (2002), Couceiro (2002) e Felismino (2005), todos avaliando a resposta morfogênica *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*, também foi verificado no extremo proximal de explantes hipocotiledonares que raízes se formaram em meios com ausência de citocininas. Segundo Felismino (2005), meios de cultivo contendo citocininas parecem interferir na polaridade fisiológica para a rizogênese, mas não para a calogênese, nesse extremo. Este comportamento sugere que a adição de citocininas rompe a relação citocinina/auxina favorável ao enraizamento adventício. Isto estaria de acordo com o postulado de Skoog & Miller (1957). Contudo, no presente trabalho, a explicação do processo rizogênico não ter sido afetado quando apenas os segmentos hipocotiledonares foram imersos em meio MS líquido por diferentes tempos em BAP, seria porque o tempo de contato com esta citocinina não foi suficiente para afetar a polaridade fisiológica.

5. CONCLUSÕES

- O BAP (0,7 mg L⁻¹) influencia a absorção de nutrientes pelos explantes hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa*.
- O tempo de imersão dos explantes em BAP está relacionado com a formação de estruturas organogênicas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.** 2002. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 670p.

BARBOSA, L.M.P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro*.** 2006. 128p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BENTO, D. de M.; MARTINS, K.; ALOUFA, M.A.L. Efeito de combinações hormonais e tipo de explante na micropropagação de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:SBF, 2004, p.15.

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

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, n.7, p.1276-1277, 1997.

FELISMINO, D.C. **Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade.** 2005. 112p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

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

KANTHARAJA, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.35, p.337-339, 1990.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efectos de la luz sobre la germinación de la parchita. **Agronomía Tropical**, v.47, n.4, p.397-408, 1997.

MARINO, S.C.; BERTAZZA, G. Micropropagation of *Actinia deliciosa* cvs. Haqyvard and Tomuri. **Scientia Horticulturae**, v.45, p.65-74, 1990.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.527-531, 2000.

MORALES ABANTO, A.; MULLER, L. Alterations producidas en el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) por deficiencias de manganeso, hierro, boro y zinc. **Turrialba**, v.27, n.2, p.163-168, 1977b.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

PITMAN, M.G. Ion transport into the xylem. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.71-88, 1977, 1977.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.

RODRIGUEZ ORTÍZ, C.E.R. **Avaliação fisiológica de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 89p. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal.

SCATENA, V.L.; NUNES, A.C. Anatomia de *Pleurothallis rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v.15, p.35-43, 1996.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Botany**, v.11, p.118-140, 1957.

SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A. Transdifferentiation of quiescent parenchymatous cells into tracheary elements. **Cell Differentiation and Development**, v.31, n.2, p.77-87, 1990.

VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MUNIZ, B.F.; CENTENO, M.L. Absorção, distribuição e metabolismo de 6-benziladenina em explantes de *Hyacinthus amethystina* cv. Albus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p.1024-1033, 1999.

WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, v.2, p.231-244, 1951.

Estresse foto-oxidativo durante a morfogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, mediado por diferentes irradiâncias

RESUMO

O objetivo deste experimento foi avaliar o estresse foto-oxidativo durante o processo organogênico em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos, com dez repetições. Os tratamentos foram os cinco níveis de irradiância (12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Observou-se grande determinação dos explantes para a formação de gemas, independentemente dos níveis de irradiância empregados. A irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi a que menos contribuiu para a formação de gemas, entretanto, foi a condição que estimulou a produção de 1 broto/explante e este apresentou em média 3,46 mm de comprimento. A irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziu 2 brotos/explante e estes apresentaram 2,0 mm de comprimento. As demais irradiâncias não foram capazes de estimular a produção de brotos. A atividade das enzimas SOD e CAT aumentou com a elevação dos níveis de irradiância até 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve declínio na atividade dessas enzimas. A POD aumentou com a elevação dos níveis de irradiância. Foi possível identificar também que a quantidade de fluxo fotônico influencia a taxa de produção de etileno e CO_2 pelos explantes hipocotiledonares dessa espécie, e que há uma relação entre produção de etileno e degradação de pigmentos foliares. Verificou-se que as duas menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram as mais eficientes no processo organogênico do maracujazeiro.

1. INTRODUÇÃO

No cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais, as irradiâncias utilizadas têm apresentado os mais variados espectros. Por exemplo, a propagação *in vitro* do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* normalmente é realizada sob exposições a uma faixa variada de irradiâncias, dependendo da finalidade do estudo. A maioria dos trabalhos indica o nível de irradiância no qual se cultivam os explantes, entretanto é digno de menção que em alguns trabalhos é citado, apenas, o fotoperíodo utilizado no processo propagativo. A faixa de irradiância normalmente utilizada nos trabalhos de propagação *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*, com vistas a distintas finalidades, pode ser assim exemplificada: multiplicação vegetativa de brotos axilares (3000 lux; Moran Robles, 1978); propagação *in vitro* de segmentos internodais (3000 lux; Moran Robles, 1979); atividade morfogênica de microcalos oriundos do cultivo de protoplastos ($22 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Dornelas & Vieira, 1993); atividade morfogênica de calos oriundos do cultivo de protoplastos ($1,5 \text{ W m}^{-2}$, D' Utra Vaz et al., 1993); microenxertia ($180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Biricolti & Chiari, 1994); propagação *in vitro* ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Faria & Segura, 1997); adequação de componentes do meio inorgânico na calogênese em segmentos de hipocótilo e folhas ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Faria & Segura, 1997); atividade morfogênica em segmentos de folha ($23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Appezzato-da-Glória et al., 1999); adequação de meio de cultivo para a propagação *in vitro* de segmentos nodais ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Monteiro-Hara et al., 2000); rizogênese de brotos ($24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Barbosa et al., 2001); organogênese em segmentos de folhas cotiledonares ($9,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Ribas et al., 2002); organogênese em segmentos hipocotiledonares ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Couceiro, 2002; 25, 50, 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Alexandre, 2002; $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Felismino, 2005); organogênese em gemas apicais, gavinhas, segmentos nodais e internodais (fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), Cantanhêde & Rodrigues, 2004); cultivo de ápices caulinares ($22 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Junghans et al., 2002); desenvolvimento de brotos axilares ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Reis et al., 2003); desenvolvimento de calos (fotoperíodo de 16 h de luz, Lopes et al., 2004); desenvolvimento de segmentos nodais ($22 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Gonçalves et al., 2004).

A luz em excesso promove a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), que conduzem a peroxidação de lipídios de membrana (Parkin et al., 1989). Cao et al.

(2006) relatam que o aumento nas concentrações de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação de lipídios, pode ser verificado em condições de altas irradiâncias, indicando estresse oxidativo. Segundo estes autores, em condições de altas irradiâncias, níveis crescentes de MDA acompanham o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), o que pode estar relacionado com a habilidade dessas enzimas em remover as espécies reativas do metabolismo do oxigênio durante o estresse foto-oxidativo (Seppanen & Fagerstedt, 2000).

A biossíntese de etileno é estimulada por alguns fatores, dentre eles as condições ambientais. Portanto, sob estresse, tem-se elevada produção de etileno, que está associada à perda de clorofila e ao desaparecimento gradual da cor, que são aspectos característicos da senescência das folhas (Taiz & Zeiger, 2004).

A degradação dos pigmentos foliares envolve, por um lado, a degeneração das membranas tilacoidais e, por outro, o efeito do etileno na senescência, como fator desencadeador do processo (Heaton & Marangoni, 1996; Matile et al., 1996). Powles (1984) verificou que prolongadas exposições dos tecidos vegetais a condições de alta radiação refletem-se na destruição dos pigmentos fotossintéticos, principalmente as clorofilas.

O presente trabalho teve por objetivo investigar o estresse foto-oxidativo em estruturas organogênicas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas

As sementes foram extraídas de frutos maduros e colhidos de uma única planta de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, procedente do pomar do Setor de Fruticultura, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em condições laboratoriais e mediante o uso de uma peneira de malha fina, o arilo das sementes foi removido, pressionando-as cuidadosamente, depois de envolvê-las

em cal extinta. Em seguida, as sementes foram lavadas em água de torneira até a completa remoção da cal e restos placentários. Depois, foram submetidas a secagem à sombra, sobre papel toalha, por três dias. Após o processo de secagem, procedeu-se o preparo das sementes. O tegumento externo (episperma) foi completamente removido com auxílio de uma mini-morsa.

As sementes, assim preparadas, foram desinfestadas, sob condições de câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foram submetidas por 1 minuto a solução de etanol a 70% (v/v), seguido de três enxaguaduras; e logo após, imersas em solução de hipoclorito de sódio com 2,4% de cloro ativo do produto comercial Candura[®], durante 20 minutos e, posteriormente, enxaguadas por três vezes, em tempos de 1 minuto, sob agitação constante em água desionizada e autoclavada.

O meio de cultivo das sementes foi constituído dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White (1951), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8,0 g L⁻¹ de ágar (Isofar[®]), como agente solidificante. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar. Alíquotas de 10 mL deste meio foram distribuídas por tubo de ensaio (25 x 150 mm). Os tubos, contendo o meio foram fechados com tampas de propileno transparentes e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,05 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

As sementes foram semeadas no meio de cultivo, uma por tubo de ensaio. Após o semeio, os tubos foram fechados como já descrito anteriormente, acondicionados em grades que foram envolvidas com papel alumínio e transferidos para a sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente 60%. O papel alumínio foi utilizado para proteger as sementes contra luz, já que são classificadas, como fotoblásticas negativas por Maciel & Bautista (1997).

O período de incubação foi de 12 dias, tempo suficiente para obter as plântulas axênicas e com tamanho adequado para se extrair cinco segmentos hipocotiledonares com comprimento de aproximadamente 1,0 cm.

2.2. Fase de cultivo dos segmentos de hipocótilo

Segmentos de hipocótilo, oriundos de plântulas germinadas e crescidas *in vitro* foram cultivados em frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, altura de 12,5 cm, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm, contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura constituído pelo sais nutrientes de MS, vitaminas de White (1951), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8,0 g L⁻¹ de ágar (Isofar[®]) como agente geleificante. O pH do meio foi ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar, o qual foi fundido em forno microondas e a esterelizado em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kgf cm⁻², durante 20 minutos. Após a esterelização e sob condições de câmara de fluxo laminar, o meio de cultivo foi resfriado o suficiente para não interferir na atividade da 6-benzilaminopurina (BAP), porém permanecendo fluído para ser distribuído nos frascos de cultivo, quando então foi adicionado ao meio 0,7 mg L⁻¹ de BAP, previamente esterilizado em filtro-esterilização (MILLEX-GS[®], 0,22µ, Millipore, US). Após a adição do fitorregulador, o meio foi agitado por aproximadamente dois minutos, visando a homogeneização, para ser, posteriormente, distribuído nos frascos de cultivo até alcançar 30 mL por frasco. Estes frascos vazios, anteriormente à distribuição do meio, foram fechados com tampa de polipropileno transparente, protegida com filme transparente de PVC (Rolopac[®]), e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,05 kgf cm⁻², durante 30 minutos.

Os segmentos de hipocótilo, em número de cinco e extraídos de uma mesma plântula, foram plantados verticalmente no meio de cultivo, em condições de câmara de fluxo laminar, de modo a ficarem aproximadamente 2 mm do extremo proximal inseridos no meio, e o extremo distal voltado para a boca dos frascos, que foram fechados com duas camadas de filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Os frascos, contendo os explantes, foram incubados em sala de crescimento, distribuídos nas prateleiras das estantes, à distância de aproximadamente 5 cm entre si, de forma a não proporcionar sombra nos mesmos, com controle de temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiâncias de 12; 25; 50; 100 e 150 µmol m⁻² s⁻¹, fornecidas por tubos fluorescentes OSRAM[®], com potência de 40 W, luz do dia.

O período de incubação foi de 42 dias.

Para a adequação dos ambientes espectrais, as estantes da sala de crescimento, tiveram que passar por algumas alterações, já que os níveis de irradiância previamente encontrados não atendiam às necessidades do referido estudo. A iluminação nas prateleiras das estantes da sala de cultivo foi fornecida por conjuntos de tubos fluorescentes, OSRAM[®], com potência de 40 W, luz do dia. Cada conjunto constituiu-se de cinco tubos, distribuídos paralelamente e separados um do outro em 5,0 cm. Cada conjunto de tubos fluorescentes estava separado do outro por 5,0 cm, de modo que a irradiância pudesse ser a mais uniforme possível ao longo de toda a superfície da prateleira. Na superfície de abrangência de cada conjunto de tubos fluorescentes, foi necessário medir a intensidade de fluxo em 65 pontos para se identificar a superfície da estante que apresentasse aproximadamente a mesma irradiância. Esta foi de $55 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida mediante uso do irradiômetro LI-COR, inc. MODELO LI-185B QUANTUM/RADIOMETER/PHOTOMETER, cujo sensor é o LI-COR, inc. SS-3 SENSOR SELETOR. Cada um dos cinco ambientes espectrais foi projetado utilizando-se dois conjuntos de 5 tubos fluorescentes. Na superfície de todas as prateleiras, foram afixadas placas de isopor, que serviram de isolante térmico, de forma a evitar aquecimento no fundo dos frascos de cultivo.

Os cinco distintos níveis de irradiâncias foram conseguidos, como descrito a seguir: a) Para o ambiente espectral de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os dois conjuntos de tubos fluorescentes receberam uma proteção dada por um anteparo constituído de duas camadas de tela sombrite esticada em quadro de madeira, onde a tela superior apresentava malha capaz de interceptar 70% de luz e a tela voltada para a base da prateleira, tendo malha capaz de interceptar 50% de luz; b) No ambiente de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os dois conjuntos de tubos fluorescentes receberam uma proteção dada por um anteparo constituído por uma única camada de tela sombrite com capacidade para interceptar 70% da luz, esticada em quadro de madeira, apresentando ainda, proteção na face frontal da prateleira, mediante uso de tela com capacidade de interceptação de 50% da luz; c) No ambiente de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os dois conjuntos de tubos fluorescentes receberam uma proteção dada por um anteparo constituído por uma única camada de tela sombrite com capacidade de interceptar 30%; e, além disso procedeu-se, ainda, o revestimento com papel alumínio da face inferior da prateleira superior, onde se

prendem os tubos fluorescentes; d) No ambiente de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, procedeu-se uma proteção na face frontal da prateleira, mediante uso de tela, cuja capacidade de interceptação de luz é de 50%, acompanhado do revestimento com papel alumínio da face inferior da prateleira superior, onde se prendem os tubos fluorescentes; e) O ambiente de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi conseguido, protegendo, frontal e lateralmente as prateleiras, na abrangência dos dois conjuntos de tubos fluorescentes, com placas de isopor, tendo estas suas faces voltadas para o interior da estante revestida com papel alumínio. A face da estante voltada para a parede, não recebeu qualquer proteção. Utilizou-se ainda, revestimento com papel alumínio na face inferior da prateleira superior, onde se prendem os tubos fluorescentes. Esse nível de irradiância, por se tratar de um ambiente quase hermético, exigiu a instalação de um exaustor para dissipação do calor, mantendo nesse ambiente a mesma temperatura da sala de cultivo ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) (Figura 1).

2.3. Características avaliadas

2.3.1. Organogênese *in vitro*

Em cada extremo distal dos segmentos de hipocótilo foi avaliado o número de gemas e brotos, comprimento dos brotos, massa da matéria fresca (MMFPA) e seca da parte aérea (MMSPA).

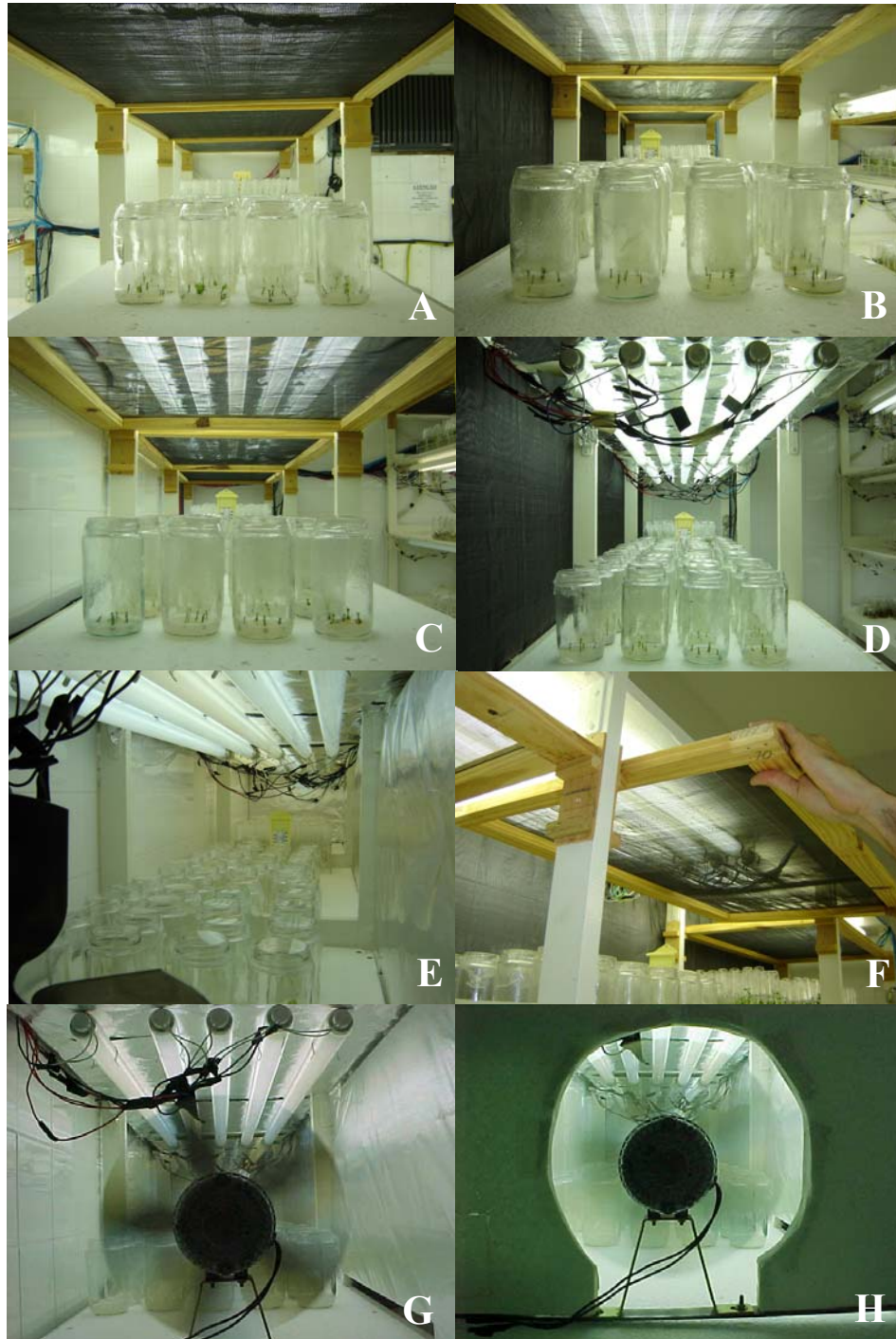


Figura 1. Ambientes espectrais: A. $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B. $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C. $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; D. $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; E. $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Detalhes: F. Anteparo constituído de uma ou mais camadas de tela sombrite esticada em quadro de madeira, G. motor de geladeira com hélice de rotação invertida; H. Idem G, com detalhe da implantação de placa de isopor

2.3.2. Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD EC1.11.1.7), catalase (CAT EC1.11.1.6) e superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1)

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade da peroxidase, catalase e superóxido dismutase foi obtido pela homogeneização de 0,5 g das estruturas (gemas e brotos) formadas na região distal dos segmentos de hipocótilo (congelados em nitrogênio líquido e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) com 4 mL de solução de extração (EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8), em almofariz de porcelana. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 12000 g por 20 minutos, utilizando o sobrenadante, de acordo com metodologia descrita por Saher et al. (2004). Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2.1. Peroxidase (POD EC1.11.1.7)

A atividade de PODs nas estruturas (gemas e brotos) foi determinada espectrofotometricamente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pelo aumento da absorvância a 470 nm, a partir da reação de 100 μL do extrato enzimático bruto diluído a 1:4 (v/v) com água desionizada em uma mistura de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, 0,5 mL de guaiacol e 0,4 mL de H_2O_2 0,59 M, em um volume total de 3 mL (Chance & Maehley, 1955). Os resultados foram expressos em $\Delta A_{470}\text{ min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.2.2. Catalase (CAT EC1.11.1.6)

A atividade das CATs nas estruturas (gemas e brotos) foi determinada após a adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de 500 μL de H_2O_2 59 mM, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e 400 μL de água desionizada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Havir & McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{ min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1)

A mistura de reação, constituída de 0,3 mL de metionina 130 μ M, 0,1 mL de azul de p-nitrotetrazólio (NBT) 2250 μ M, 0,1 mL de EDTA 3 μ M, 0,2 mL de riboflavina, 0,75 mL de água desionizada e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,8 (Del Longo et al., 1993), adicionaram-se 100 μ L do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C, em tubos de ensaio dispostos em orifício eqüidistantes de tubo fluorescente de 15 W, colocado no centro de uma câmara de incubação circular e foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente. Após 15 min, o desligamento do tubo fluorescente interrompeu a reação, sendo a produção de formazana azul medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraído de um “branco”, no qual não havia extrato enzimático. Nestas condições, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Giannopolitis & Ries, 1977; Totola, 1998).

2.3.2.4. Quantificação de proteínas

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão.

2.3.3. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica nas estruturas (gemas e brotos) foi expressa como teor de malondialdeído (MDA), determinado pelo método de TBARS (Buege & Aust, 1978). Amostras de tecidos dessas estruturas (100 mg de matéria fresca) foram homogeneizadas em 5,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PMF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Retirou-se do sobrenadante uma alíquota de 1,0 mL, à qual adicionou-se 4,0 mL da mistura contendo 10% (p/v) de TCA e 0,5% de TBA, contendo 0,01% de BHT (butilhidroxitolueno). Em seguida, os tubos de ensaio contendo

a mistura, foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. O “branco” foi preparado sem a amostra, porém seguindo todas as outras etapas. A absorvância do sobrenadante foi lida a 535 nm e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Dhindsa et al. (1981), conforme a seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\zeta \cdot b)$, onde, ζ (coeficiente de extinção) = $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e b (comprimento ótico) = 1 cm.

2.3.4. Produção de etileno (C₂H₄) e dióxido de carbono (CO₂)

Para a avaliação do acúmulo de etileno e CO₂, cada tratamento constitui-se de 40 frascos contendo cada frasco 5 segmentos de hipocótilo que, de 7 em 7 dias, 6 destes frascos de cada tratamento foram tomados, para a determinação dos gases. Os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar por 30 minutos e novamente vedados com duas camadas de filme plástico. As leituras foram realizadas após 24 horas para cálculo da taxa de produção dos gases. Retirou-se dos frascos duas amostras dos gases liberados pelos tecidos, com auxílio de seringas, de 1 mL cada; a alíquota amostrada foi injetada em cromatógrafo a gás (Modelo GC – 1413, Shimadzu Kyoto), equipado com detector TCD e FID para determinação das concentrações de etileno e CO₂. As temperaturas da coluna (porapak-Q), do injetor e do detector foram de, respectivamente, 50, 100 e 135 °C.

A taxa de produção de etileno e CO₂ foi expressa em nL C₂H₄ g MF⁻¹ h⁻¹ e mmol CO₂ g MF⁻¹ h⁻¹, respectivamente, segundo as equações: $TX = C \cdot V \cdot t^{-1} \cdot p^{-1}$ e $TX = C \cdot V \cdot 10 \cdot t^{-1} \cdot p^{-1}$, respectivamente, onde C = concentração do etileno e/ou de CO₂ no frasco (nL mL⁻¹ e/ou mmol mL⁻¹, respectivamente); V = volume da fase gasosa (mL); t = tempo de acúmulo (horas); p = massa da matéria fresca (g).

2.3.5. Determinação dos pigmentos foliares

Para a análise dos pigmentos foliares, foram removidas todas as estruturas (gemas e folhas) formadas durante o processo organogênico e pesadas individualmente até atingirem 0,1 g. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução de 20 mL de dietil éster por 24 horas, em frascos envolvidos com papel alumínio, como forma de proteção contra luz. O extrato foi colocado em uma cubeta de quartzo, realizando-se as leituras em espectrofotômetro UV/VIS digital, marca HITACHI, modelo U-2001, cuja densidade óptica das amostras foram lidas a 660,6; 642,2 e 470 nm. Foram determinados os teores de clorofilas a, b e totais e de carotenóides, além das relações clorofila a/b e carotenóides/clorofilas.

2.3.6. Análise de cor

Para a avaliação da cor utilizou-se colorímetro de triestímulos COLOR QUEST II e o software Universe da Hurterlab, Reston, VA, sob o iluminante D nos sistemas de cor de Hunter com os parâmetros L, a, b; onde L representa a luminosidade, que caracteriza o grau de claridade da cor; +a, o vermelho; -a, o verde; +b, o amarelo; -b, o azul.

Nas medições de cor, o material organogênico (gemas e brotos, 0,1 g), foi incubado em solução de 20 mL de dietil éster por 24 horas, em frascos envolvidos com papel alumínio, como forma de proteção contra luz. O extrato foi colocado em uma cubeta de quartzo de 80:60:15 mm, realizando-se as leituras. Com os valores obtidos nas leituras das coordenadas a e b, foram calculados os valores da tonalidade ou nuance, $h = \arctg(b/a)$ e da saturação da cor ou croma, $C = \sqrt{a^2 + b^2}$. A saturação ou cromaticidade da cor é a qualidade que caracteriza a quantidade de cor, indicando os níveis em que está misturada com o branco, o preto ou o cinza. A tonalidade da cor ou matiz é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor, o que possibilita a diferenciação das cores.

2.4. Delineamento experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições (6 frascos de cultivo), onde os tratamentos foram os 5 níveis de irradiância, sendo a parcela experimental constituída de 5 segmentos de hipocótilo (1 frasco de cultivo) cultivados na orientação vertical normal.

3. RESULTADOS

Foi verificado nos diferentes níveis de irradiância que os explantes apresentavam grande determinação para a formação de numerosas gemas em toda a superfície cortada do extremo distal dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. Essa profusão de gemas formadas diretamente na base do tecido (organogênese direta) possivelmente tenha provocado uma competição entre elas, de sorte que ao final de 42 dias de incubação dos explantes, constatou-se reduzido crescimento dessas gemas (Figura 2A) e, conseqüentemente, de brotos formados (Figura 2B).

Os níveis de irradiância de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram os mais eficientes em estimular a atividade morfogênica nos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*. Nestes ambientes espectrais, formaram-se 8 gemas, respectivamente, após a exposição por 42 dias às referidas irradiâncias (Figura 2A). A irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi a que contribuiu menos na formação de gemas (ao redor de cinco gemas).

Os segmentos de hipocótilo cultivados nos ambientes de menor irradiância (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram os únicos cujas gemas evoluíram para formarem brotos, pois naqueles cultivados sob as irradiâncias de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as estruturas formadas permaneceram no estágio de gemas, ao cabo dos 42 dias de incubação. Dentre as, aproximadamente, cinco gemas formadas sob a irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apenas uma, por segmento de hipocótilo, alcançou a categoria de broto, ao passo que no ambiente de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, das quase 6 gemas formadas, 2 lograram o status de broto (2 brotos/explante, Figura 2B).

Apesar dos segmentos de hipocótilo cultivados sob $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ terem originado apenas 1 broto por explante, estes foram os que atingiram o maior crescimento (3,46 mm). A irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contribuiu para a formação de brotos com menor tamanho (2,0 mm, Figura 2C).

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos tecidos dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* aumentou com a elevação dos níveis de irradiância até $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve marcado declínio na atividade dessas enzimas (Figura 3).

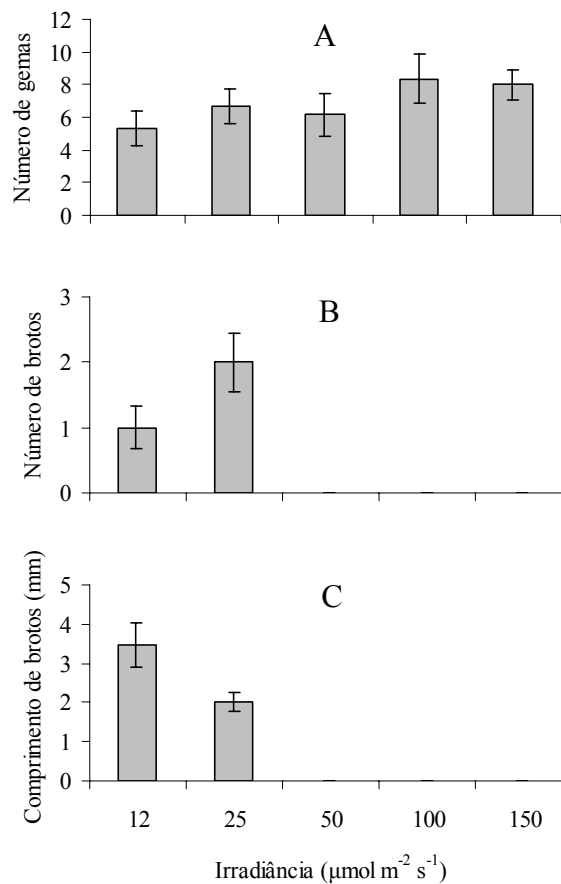


Figura 2. Número de gemas (A), de brotos (B) e comprimento de brotos (C) provenientes de segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

O maior acréscimo na atividade das enzimas SOD e CAT foi observado na irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se comparado ao ambiente de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). Todavia, em relação à irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a atividade das enzimas SOD e CAT teve um pequeno acréscimo em relação a mais baixa irradiância estudada (Figura 3).

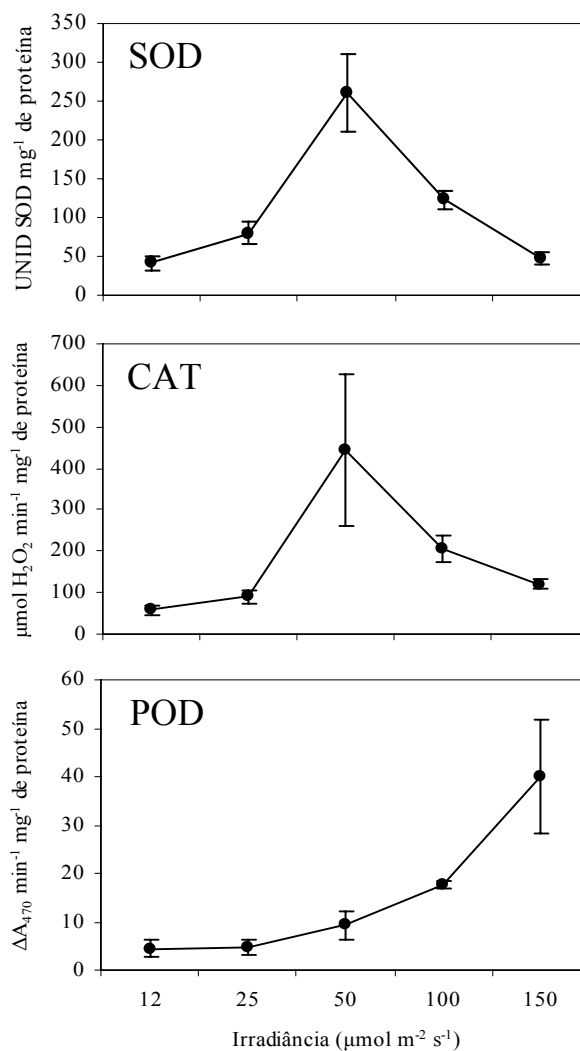


Figura 3. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

O aumento da atividade da peroxidase (POD) nos tecidos de segmentos de hipocótilo do maracujazeiro foi maior na irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e menor na irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em comparação àqueles segmentos cultivados sob irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). Com isso, é possível inferir que a irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contribuiu pouco no aumento da atividade da enzima POD. Entretanto, aqueles segmentos cultivados em ambientes espectrais acima de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram os maiores aumentos da atividade dessa enzima.

O aumento dos níveis de irradiância até $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fez elevar proporcionalmente a produção de MDA (malondialdeído), que é um produto da peroxidação de lipídios (Figura 4). O maior teor de MDA ($81,2 \text{ nmoles}$) foi encontrado nos tecidos dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro cultivados sob $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondeu a $25,23 \text{ nmoles}$ a mais daquele obtido nos segmentos hipocotiledonares cultivados no menor nível de irradiância ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que foi de $55,97 \text{ nmoles}$. O acréscimo desse produto da peroxidação nos tecidos dos explantes cultivados nos demais níveis de irradiância foi de $16,15$ ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $12,03$ ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e de apenas $5,35 \text{ nmoles}$ ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

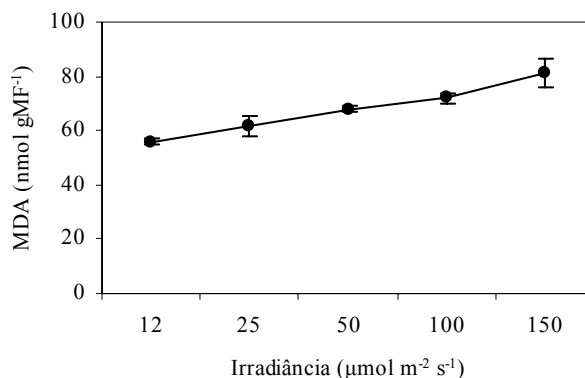


Figura 4. Peroxidação de lipídios (teor de MDA) em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

A atividade peroxidativa nos segmentos de hipocótilo acentuou-se com os níveis crescentes de irradiância (Figura 4) e esse efeito acompanhou o aumento da atividade

das enzimas SOD e CAT até o nível de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3), possivelmente pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, culminando com a ativação de um sistema antioxidante para a captura desses radicais livres. Entretanto, nos ambientes espectrais acima de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o metabolismo celular, em relação à ativação dessas enzimas, pareceu estar entrando em inativação, já que houve queda na atividade dessas enzimas (Figura 4). No entanto, a lipoperoxidação teve comportamento crescente com a elevação dos níveis de irradiância (Figura 4), bem como a atividade da enzima POD (Figura 3).

Nas irradiâncias de 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observa-se, inicialmente, o processo de enverdecimento dos explantes e a atividade morfogênica com a formação de gemas aos 21 dias (Figuras 5Ca e Cb) e sua evolução para brotos aos 35 dias (Figuras 5Ea e Eb).

O aspecto clorótico das gemas formadas na região distal dos segmentos de hipocótilo é facilmente visualizado nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 7 dias de cultivo. Observa-se até ao longo do segmento, dificuldade de enverdecimento do tecido (Figuras 5Aa e Ab, respectivamente). Aos 21 dias, as estruturas formadas nos segmentos de hipocótilo cultivados sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ adquiriram aspecto esbranquiçado (Figuras 5Cc). Mesmo assim, houve desenvolvimento, porém lento dos órgãos formados (Figuras 5Dc, Ec e Fc). Nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se mudanças marcantes de coloração das estruturas formadas. Estas passaram de amarelas (7 dias, Figuras 5Ad e Ae, respectivamente) para brancas (14 dias, Figuras 4Bd e Be, respectivamente). Essa coloração branca dos tecidos permaneceu até os 35 dias (Figuras 5Ed e Ee, respectivamente), que finalizaram com a tonalidade bronzeada, aos 42 dias, nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 5Fd e Fe, respectivamente), aspecto este relacionado ao processo oxidativo. Esse aspecto de bronzeamento dos tecidos ficou mais evidente em folhas originadas de segmentos de hipocótilos cultivados no ambiente com $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5Fe).

Nos segmentos de hipocótilos cultivados sob as irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se grande determinação para a formação de gemas, caracterizando um emaranhado dessas estruturas, as quais não conseguiram evoluir em função do grande número produzido. Esse talvez seja o motivo pelo qual não houve formação de brotos ao final de 42 dias do cultivo dos segmentos de hipocótilo.



Figura 5. Segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. aos 7 (A), 14 (B) 21 (C), 28 (D), 35 (E), 42 (F) dias do cultivo *in vitro* nas irradiâncias de 12 (a), 25 (b), 50 (c), 100 (d), 150 (e) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

No início da atividade morfogênica (formação de gemas) nos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro foi possível identificar, nos ambientes de 50 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, regiões com coloração arroxeada (Figuras 6A e 6B, respectivamente). Essa tonalidade parece estar relacionada com produção de antocianinas. Com as análises feitas até o momento, não foi possível identificar se essas manchas arroxeadas são realmente antocianinas.



Figura 6. Detalhes de pigmentos púrpuros presentes em folhas durante a atividade morfogênica em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados nos ambientes de 50 (A) e 100 (B) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 7 dias do cultivo *in vitro*.

Aos 7 dias de cultivo *in vitro* dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, verificou-se produção de etileno na ordem de 99,81; 457,33; 753,75; 852,00 e 942,20 nL $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ gMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nos ambientes de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, respectivamente (Figura 7). Aos 14 dias de cultivo, a produção de etileno pelos segmentos de hipocótilo reduziu-se nas respectivas irradiâncias, cerca de 98,24% (12); 99,68% (25); 99,44% (50); 99,40% (100) e 99,46% (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 7).

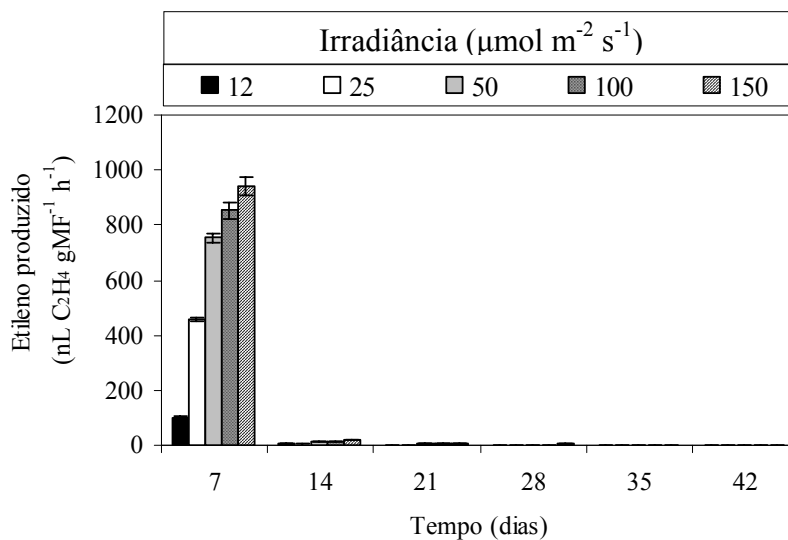


Figura 7. Produção de etileno pelos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias do cultivo nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

Como ocorrido para o etileno, também para o CO_2 as maiores concentrações deste gás produzidas pelos segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram observadas aos 7 dias de cultivo. Neste tempo, a maior taxa de produção de CO_2 foi encontrada naqueles explantes cultivados sob irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a menor na irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8).

Aos 14 dias, o comportamento dos explantes quanto a produção de CO_2 foi muito semelhante aos 7 dias, porém, atingindo valores menores da concentração de CO_2 . Também aos 14 dias, foi na maior irradiância (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que se verificou a maior concentração de CO_2 (Figura 8).

A partir do 21º dia de cultivo, houve grande limitação dos segmentos de hipocótilo, quanto à produção de CO_2 , se comparado aos 7 e 14 dias de cultivo (Figura 8).

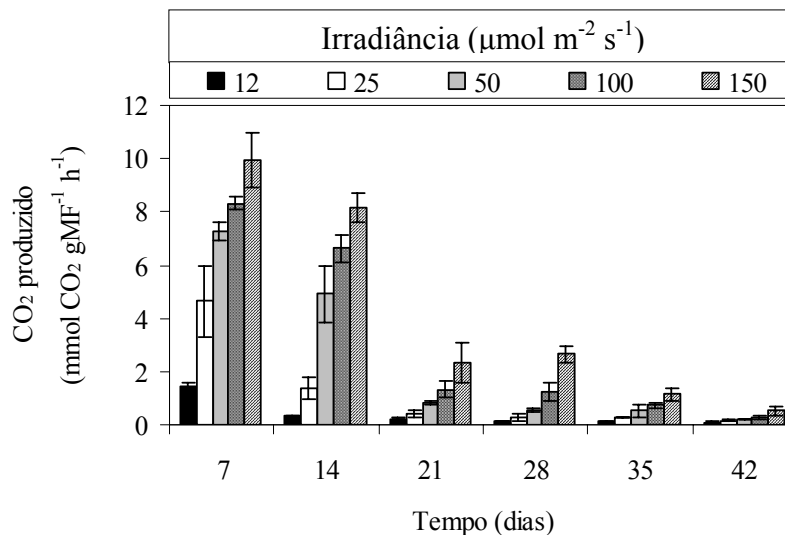


Figura 8. Produção de CO_2 pelos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias do cultivo nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

O aumento dos níveis de irradiância promoveu redução no conteúdo de clorofila a (Figura 9A), clorofila b (Figura 9B), clorofila total (Figura 9C), relação clorofila a/b (Figura 9E) e carotenóides (Figura 9D). Entretanto, o aumento dos níveis de irradiância resultou, proporcionalmente em maiores valores da relação carotenóides/clorofilas (Figura 9F), devido à queda nos valores de carotenóides ter sido proporcionalmente inferior à dos valores de clorofila.

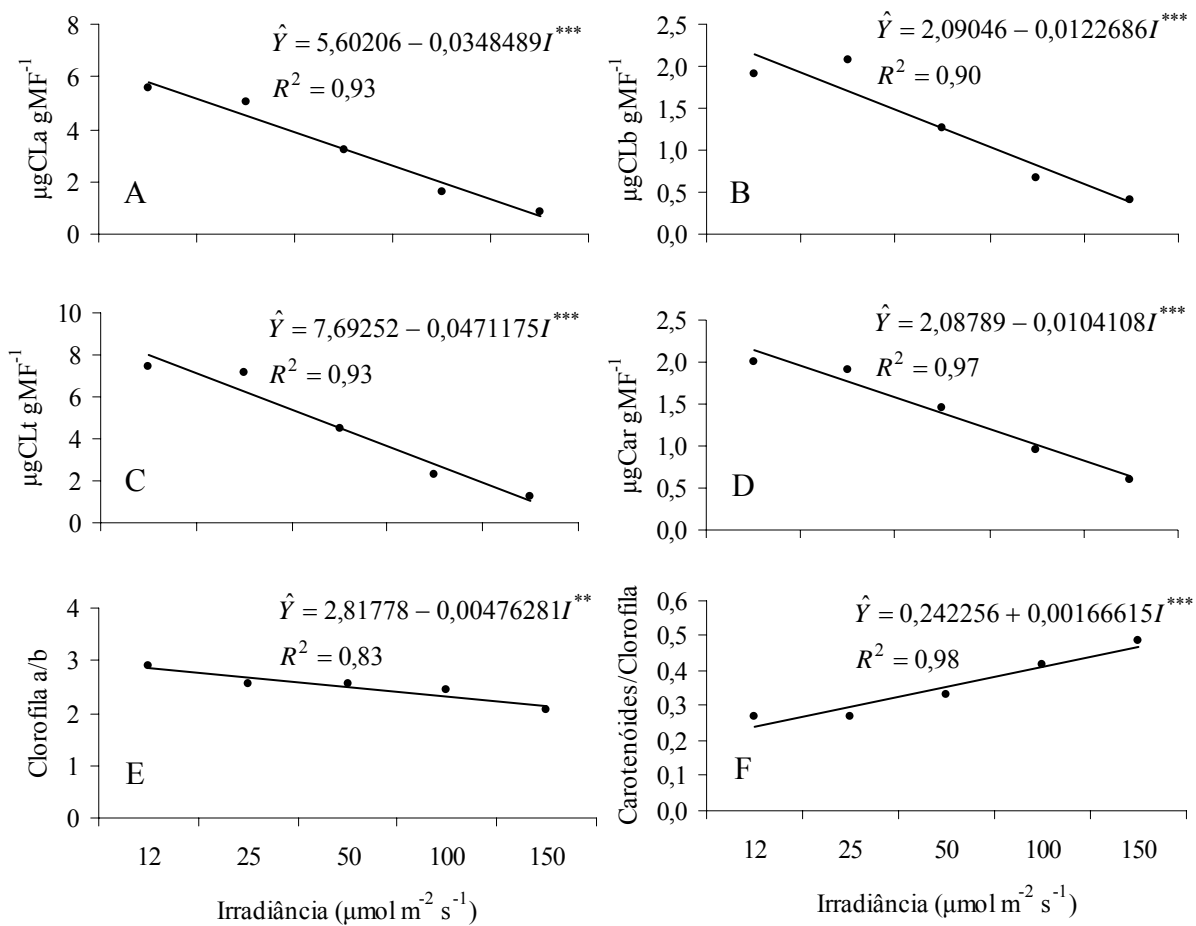


Figura 9. Teores de clorofilas a (A), b (B), total (C) e carotenóides (D) e as relações clorofila a/b (E) e carotenóides/clorofilas (F), em estruturas organogênicas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, obtidas nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 42 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo.

** e *** Significativo ao nível de 1% e 0,1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

Observou-se, na irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, menor valor da coordenada “L” (62,59) e na irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o maior valor (63,93). Nos ambientes espectrais estudados, verificou-se aumento linear crescente nos valores de “L” com a elevação dos níveis de irradiância (Figura 10A).

Os valores da coordenada “a” foram negativos em todos os níveis de irradiância estudados. O menor valor de “a” correspondeu ao menor nível de irradiância ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), havendo aumento linear com o aumento da irradiância, aproximando-se de zero na irradiância ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 10B).

Em relação à coordenada “b”, em todos os tratamentos, observou-se valores positivos. O maior valor encontrado foi de 12,04 na irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reduzindo-se linearmente até o menor valor (3,55), obtido na irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 10C).

Todos os valores da tonalidade foram negativos. O menor foi observado na irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-1,07), aumentando linearmente até a irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-0,91) (Figura 10D).

Verificou-se maior saturação na irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (13,75), e o menor valor (4,55) na de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Houve decréscimo linear nos valores de saturação à medida que aumentou-se os níveis de irradiância (Figura 10E).

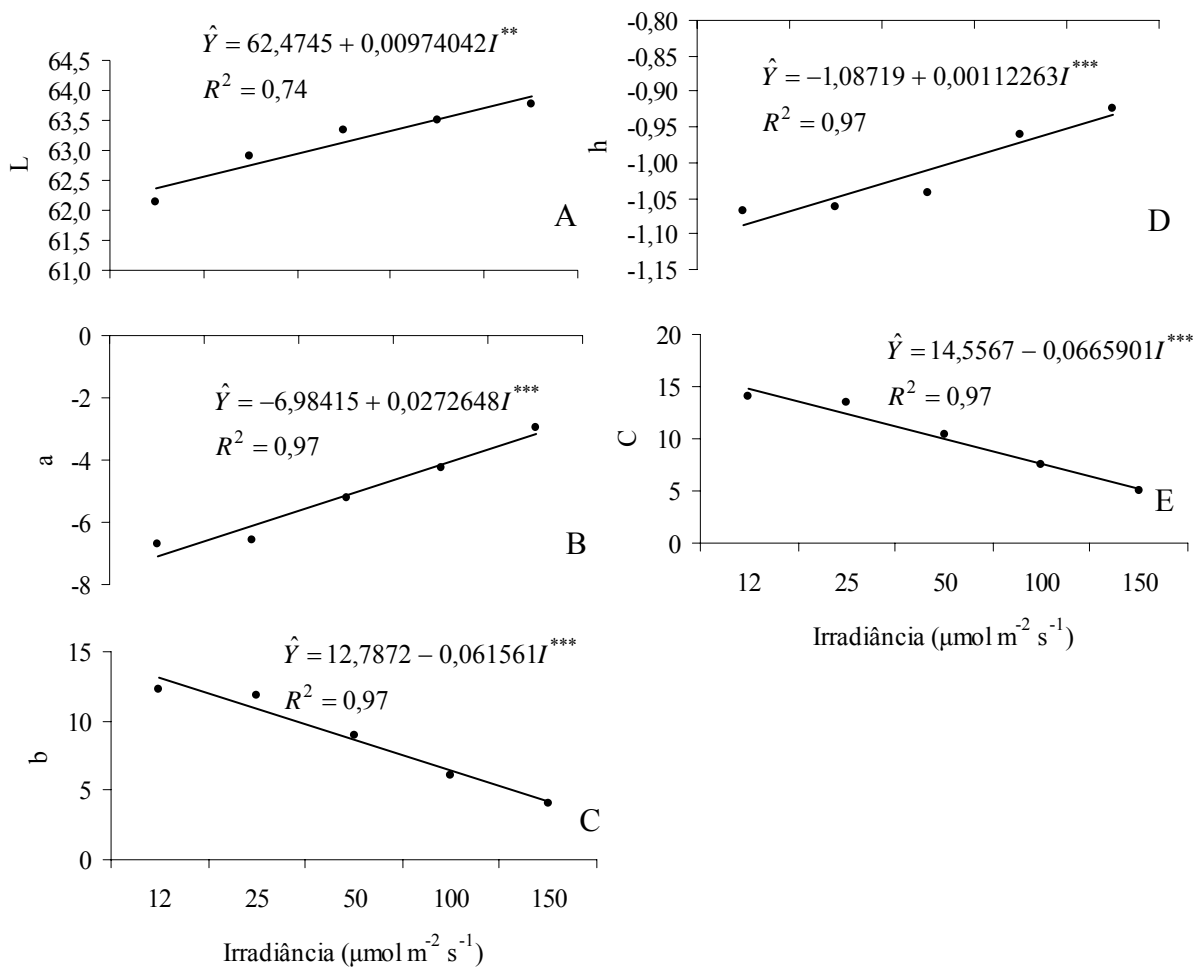


Figura 10. Medidas das coordenadas L (A), a (B), b (C), tonalidade (h, D) e saturação da cor (C, E) pelo sistema de cor de Hunter em extratos de tecidos de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* provenientes do processo organogênico, em diferentes irradiâncias.

** e *** Significativo ao nível de 1% e 0,1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, verificou-se formação de gemas, por organogênese direta, ao longo de toda a região excisada do extremo distal dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, independente dos níveis de irradiância a que foram cultivados.

Com base em análises histológicas, Felismino (2005), verificou no extremo distal de segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivados na orientação vertical normal, a formação de gemas pela via direta. Essa via organogênica, nesse mesmo tipo de explante de *P. edulis* f. *flavicarpa*, já havia sido descrita anteriormente por Alexandre (2002) e Couceiro (2002). O presente trabalho está de acordo com o exposto acima pelos autores, que verificaram apenas a formação de gemas a partir de explantes hipocotiledonares e que a atividade morfogênica nesse tecido ocorre de forma direta. Os autores acima citados também detectaram grande dificuldade da conversão das gemas em brotos nesta espécie.

Como mencionado anteriormente, a não brotação das gemas pode-se dever a competição entre elas, pelo seu elevado número. Entretanto, somente isso não constitui explicação cabal, visto que o número de gemas por explante nas irradiâncias de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não difere muito, e na irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o número de gemas que formaram brotos foi o dobro. Entretanto, verificou-se menor tamanho dos brotos sob a irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em comparação àqueles formados a partir de segmentos submetidos a 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Isso pode dever-se à competição estabelecida entre os dois brotos que se formam na irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto na irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apenas um broto se desenvolveu.

Entretanto, Appezzato-da-Glória et al. (2005), ao promoverem análises anatômicas do processo organogênico *in vitro* nas espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. cincinnata* constataram grande determinação dos explantes foliares e hipocotiledonares para a formação direta de primórdios foliares. Isto contrasta com os trabalhos obtidos por Alexandre (2002), Couceiro (2002) e Felismino (2005) no referente à organogênese em segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, onde os três autores verificaram que os primórdios foliares sempre se formavam com o alongamento das

gemas. Todavia, observaram maior frequência de gemas obtidas a partir de explantes hipocotiledonares, de que de discos foliares. Conforme relatado por Appezzato-da-Glória et al. (2005), esse caminho organogênico é preocupante, pois a presença do meristema apical caulinar é essencial para a produção de brotos. Esses autores, mostraram ainda que, as estruturas foliares isoladas têm a sua base inserida diretamente no explante, enquanto as gemas caulinares apresentam os primórdios foliares saindo de um eixo comum. Neste caso, os autores verificaram que o processo organogênico é assincrônico; gemas, estruturas foliares e protuberâncias podem ser observadas em diferentes etapas de desenvolvimento em um mesmo explante. Biasi et al. (2000), ao estudarem o processo organogênico em segmentos internodais de plantas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, também constataram a formação de primórdios foliares. Segundo esses autores, o efeito residual do BAP promoveu maior número de brotos por explante em detrimento de seu alongamento.

Fernando et al. (2005) mostraram que a maioria das gemas de *P. edulis* f. *flavicarpa* formaram-se a partir de meristemóides originados nas camadas periféricas das protuberâncias (estruturas de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro, formadas a partir de meristemóides). As protuberâncias formadas a partir de discos foliares produziram mais de uma estrutura na sua superfície, e estas eram folhas, enquanto nos explantes hipocotiledonares as protuberâncias apresentaram-se individualizadas e com as camadas epidérmicas e subepidérmicas definidas. Segundo os autores, a possível falha na determinação dos meristemóides que levam à formação das protuberâncias pode ser consequência do período em que os explantes permaneceram em meio de indução, contendo BAP. Gahan et al. (2003) informaram que a superexposição das células às citocininas leva à morte celular, o que possivelmente explica a falha no desenvolvimento de algumas células ou explantes quando expostos por períodos prolongados ao regulador de crescimento.

Appezzato-da-Glória et al. (1999) observaram que explantes foliares cultivados em meio MS contendo BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), sob luz ($23 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), apresentaram alterações na região do bordo foliar e que, no 14º dia de cultivo, as divisões nas camadas mais periféricas conduziram à formação de áreas meristemáticas, chamadas “meristemóides”. A presença de alguns brotos em fases distintas de desenvolvimento foi

observada no 28º dia, confirmando a origem meristemática dos brotos. Assim, os brotos adventícios foram desenvolvidos de áreas que continham os meristemóides depois da segunda semana de cultivo, como resultado da atividade mitótica de células parenquimáticas. A identificação desse centro meristemático ou “meristemóide” de forma continuada já havia sido constatado por Moran Robles (1979) nas espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molissima*, durante os vinte primeiros dias de cultivo dos explantes.

O decréscimo da atividade da SOD nos tecidos dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3) significa baixa conversão do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Isso implica acúmulo do radical superóxido, favorecendo subsequente a formação do radical hidroperoxila (HO^{\cdot}_2) que é a forma protonada do radical superóxido. O hidroperoxila tem como característica ser mais reativa que o superóxido e apresentar maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (Ferreira & Matsubara, 1997). Este fato pode ser confirmado pelo aumento do conteúdo de malondialdeído (MDA) com a elevação dos níveis de irradiância a que foram submetidos os segmentos hipocotiledonares (Figura 4). Segundo Shimizu et al. (1984), o radical HO^{\cdot}_2 é considerado o mais reativo para a catalase (CAT), podendo difundir-se facilmente em membranas, representando, por conseguinte, o principal agente inativador dessa enzima. O declínio na atividade da enzima CAT, observado em segmentos de hipocótilo do maracujazeiro cultivados nos ambientes de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se deve, provavelmente, à sua inativação promovida por ROS, como por exemplo, o radical hidroperoxila (HO^{\cdot}_2). Ye et al. (2000) observaram, em plantas de feijoeiro, diminuição da atividade da CAT sob altas irradiâncias. Verificaram ainda que, a re-síntese da CAT compensa a sua perda e mantém o seu nível constante, quando as plantas dessa espécie são transferidas para ambientes cuja irradiância não conduz ao estresse.

Shang & Feierabend (1999) verificaram que existe uma relação entre a dependência da inativação da catalase com os diferentes comprimentos de onda. Dessa forma, sob luz azul a extensão da inativação da catalase aumenta continuamente com a elevação dos níveis de irradiância, enquanto, sob luz vermelha, a inativação somente

ocorreu a partir de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e com menor intensidade, se comparado à luz azul. Na faixa do vermelho-distante não ocorreu inativação dessa enzima.

De acordo com Arora et al. (2002), o nível da enzima catalase (CAT), presente nos peroxissomos é ineficiente na remoção de baixas concentrações de H_2O_2 , sendo estas moléculas reduzidas pela ação da glutatona e das peroxidases. Portanto, a atuação da CAT torna-se mais importante quando a concentração de H_2O_2 está em níveis mais elevados.

Na Figura 3, é possível observar o exposto acima pelo autor, isto é, aumento da atividade da peroxidase (POD) com os níveis crescentes de irradiância, já que o papel da referida enzima é o de aumentar sua atividade, principalmente em condições de baixas concentrações de H_2O_2 . Esse aumento da atividade da POD, verificado principalmente a partir da irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3), pode ser a explicação da não formação de brotos nos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro, pois segundo Sitbon et al. (1999), esta enzima promove, por um lado, a oxidação do AIA, e conseqüentemente está envolvida com a biossíntese da lignina, e, por outro, a modulação das propriedades da parede celular durante o crescimento da planta (Bacon, 1997). Sofo et al. (2005) também relacionaram alta atividade da POD com o aumento da lignificação e oxidação, e com a conseqüente inativação do AIA. Portanto, o aumento da atividade da POD contribuiu para a restrição da expansão da célula, que, em troca, causa limitação no crescimento de brotos (Dichio et al., 2002). Assim, o aumento na atividade da peroxidase significa menos auxina para o crescimento (Arezki et al. 2001). A POD tem maior afinidade pelo H_2O_2 , se comparado a CAT, porém requer algum componente fenólico (por exemplo, o guaiacol) como substrato (Mehlhorn et al., 1996).

A maior produção de etileno, verificada aos 7 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, nas maiores irradiâncias ($50, 100$ e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 7), promoveu clorose nos órgãos formados (gemas e brotos), nas fases iniciais do desenvolvimento, aos 14 dias (Figuras 5Bc, Bd e Be, respectivamente). Faria & Segura (1997) relataram que a capacidade morfogênica de explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi limitada pelo acúmulo de etileno *in vitro*. Nestes ambientes de maior irradiância, os valores mais elevados da coordenada “L” (Figura 10A), indicam tecidos mais claros, possivelmente devido à maior produção e acúmulo

de etileno nos frascos de cultivo. Concomitantemente, por intermédio da coordenada “a” (Figura 10B), foi possível também identificar nesses ambientes de maior irradiância, tecidos menos verdes. Na região distal dos segmentos de hipocótilo cultivados por 42 dias, sob a irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificou-se aumento da senescência, evoluindo para tecidos com aspecto dourado, típico de processo oxidativo (Figura 5Fe). Verificou-se também que os ambientes de maior irradiância ($50, 100$ e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 8) estimulam a produção de CO_2 pelos segmentos hipocotiledonares dessa espécie. Essa maior produção de CO_2 *in vitro*, aos 7 dias, independentemente dos níveis de irradiância estudados, pode, em parte, dever-se ao aumento da produção de etileno, promovido pelos ferimentos nos tecidos causado pela individualização dos 5 segmentos de hipocótilo. Em função dessa injúria nos tecidos, os explantes sob estresse produziram etileno que foi possivelmente catabolizado, tendo como produto da quebra metabólica, o dióxido de carbono (Raskin & Beyer Junior, 1989). Segundo Taiz & Zeiger (2004), a biossíntese de etileno é estimulada por vários fatores, incluindo os ambientais, lesões físicas e químicas, ao passo que ferimentos químicos estimulam a atividade da enzima ACC sintase e os físicos a ACC oxidase (Fluhr & Mattoo, 1996). Considerando que, em geral, as regiões meristemáticas e de nós são ativas na biossíntese de etileno, e conseqüentemente, as folhas jovens produzem mais etileno que as folhas totalmente expandidas, esta pode ser uma das explicações para o aumento na produção de CO_2 onde o etileno pode ser completamente oxidado a CO_2 (Buchanan et al., 2000; Taiz & Zeiger, 2004).

Na espécie *Carica papaya* L., Magdalita et al. (1997) observaram o contrário, menor produção de etileno quando segmentos nodais foram cultivados *in vitro*, sob $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se comparado à irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Magdalita et al. (1997) observaram redução na senescência dos tecidos do mamoeiro. Durante a formação de brotos axilares do mamoeiro *in vitro*, os referidos autores constataram acúmulo de etileno e com os brotos mostrando-se epinásticos e com abscisão foliar, após 3 semanas de cultivo; porém, aqueles cultivados por 1 semana e submetidos, subseqüentemente, à aeração por 5 semanas, exibiram crescimento vigoroso com folhas maiores e verdes. Portanto, o etileno pode ser fundamental no período de iniciação do broto axilar, mas sua presença por períodos mais prolongados inibe o crescimento subseqüente do broto

(Lai et al., 1998). A baixa produção de etileno em irradiâncias menores, pode juntamente com alterações no balanço de giberelinas e auxinas, promover aumento no crescimento de plantas (Kurepin et al., 2006).

Jona et al. (2002) verificaram que o etileno, inicialmente, estimula a síntese de clorofila em plantas *in vitro* e que a presença desse gás em período curto de tempo, não excedente a 6 dias, é benéfico à planta. Como o etileno é antagonista à auxina, supõe-se que o efeito inicial do etileno é de diminuir a concentração de auxinas nos tecidos do explante, aumentando a relação citocinina/auxina (Abeles, 1972).

Observa-se, com o decréscimo nos teores de clorofila a, b, total, carotenóides e da relação clorofila a/b (Figuras 9A, B, C, D e E), que a elevação dos níveis de irradiância afetou a biossíntese ou degradação dos pigmentos cloroplastídicos. Segundo Lu et al. (2003), a perda de clorofila é um fenômeno típico de senescência foliar. Os autores definiram nesse trabalho, como folhas normais, aquelas que apresentaram cerca de $690 \mu\text{mol clorofila m}^{-2}$, enquanto aquelas com 350 e $170 \mu\text{mol clorofila m}^{-2}$ foram classificadas como moderadamente e severamente senescentes. Em relação ao presente trabalho, em termos proporcionais, podemos considerar, pelo teor de clorofila total, obtidos nos ambientes de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que os tecidos são considerados moderadamente e severamente senescentes, respectivamente, de acordo com o modelo comparativo de Lu et al. (2003). Nestes ambientes, a perda do conteúdo de clorofila foi maior nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, se comparado ao menor nível de irradiância estudado ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 9C). Por outro lado, verificou-se aumento na relação carotenóides/clorofilas (Figura 9F), à medida que elevou-se os níveis de irradiância. Isto indica que, nas maiores irradiâncias, os tecidos apresentam mais carotenóides, se comparado àqueles nas menores irradiâncias. Quiles & López (2004), ao isolarem cloroplastos de folhas de aveia, verificaram aumento, porém pequeno, da relação carotenóides/clorofilas em plantas expostas à irradiâncias mais altas. Segundo Behera & Choudhury (2001), baixa relação clorofila total/carotenóides indica mais carotenóides nas folhas. Segundo Taiz & Zeiger (2004), as folhas de sombra apresentam mais clorofila por centro de reação, a razão clorofila b/a é mais alta e são geralmente mais finas do que as folhas de sol. Martinez et al. (2005) verificaram aumento na relação carotenóides/clorofilas em folhas de plantas crescidas a pleno sol, se

comparado à condições de sombra. Segundo Choudhury & Behera (2001), os carotenóides atuam como pigmentos fotoprotetivos, protegendo as clorofilas do excesso de radiação, neutralizando a clorofila triplete e oxigênio singleto.

Na região verde das folhas, os carotenóides são muito importantes na proteção cloroplastídica (Bartley & Scolnik, 1995). No complexo pigmento-proteína, os carotenóides associados às clorofilas desativam a clorofila excitada e assim pode dissipar o excesso de energia (Matile, 2000). Os carotenóides convertem as formas potencialmente tóxicas de clorofila (triplete) e oxigênio (singleto), em formas não tóxicas (clorofila singleto e oxigênio triplete). Após as transformações, os carotenóides ficam num estado triplete, retornando ao estado fundamental, liberando o excesso de energia (Goodwin & Mercer, 1983).

A membrana dos tilacóides contém uma gama de carotenóides fotoprotetivos. A violaxantina tem essa função protetora, devido a sua localização e ação, quando há alterações no ambiente luminoso. Altas irradiâncias provocam mudanças nas membranas tilacóidais e causa ancoragem do complexo coletor de luz do fotossistema II (LCH II). Há evidências de que essa ancoragem da proteína LCH II está associada com alterações na conformação e orientação dos pigmentos, como a torção de algumas moléculas do ciclo das xantofilas durante a ancoragem. Como a transferência de energia dos carotenóides para as clorofilas requer aproximação maior dos pigmentos, essa modificação da orientação, distancia os pigmentos na antena, podendo impedir a transferência de energia. Isso foi observado *in vivo*, após iluminação de folhas com intensidades altas, na qual provocou diminuição no rendimento quântico da evolução do O₂. Embora pouca atenção foi dada à possível função protetora dos carotenóides, é concebível que esta mudança conformacional nos complexos coletores de luz assegure à violaxantina liberdade necessária de movimento para operar o ciclo das xantofilas (Havaux, 2001).

5. CONCLUSÕES

- As menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) são as mais eficientes no processo morfogênico em segmentos hipocotiledonares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*;

- Há uma relação direta entre a não formação de brotos, nas maiores irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com a elevação da atividade da peroxidase;
- O avanço na peroxidação de lipídios de membrana é determinado pela queda na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- A quantidade de irradiância incidida sobre os segmentos hipocotiledonares influencia a emissão de etileno e CO_2 e existe uma relação entre produção de etileno e biossíntese ou degradação de pigmentos foliares

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B. Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. **Annual Review of Plant Physiology**, v.23, p.259-292, 1972.

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. 2002. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, 670 p.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.

AREZKI, O.; BOXUS, P.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v.33, p.215-219, 2001.

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Low temperature and oxidative stress. **Current Science**, v.82, p.1227-1238, 2002.

BACON, M.A.; THOMPSON, D.S.; DAVIES, W.J. Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought ? **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.317, p.2075-2085, 1997.

BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v.7, n.1, p.47-54, 2001.

BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell**, v.7, p.1027-1038, 1995.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p.661-665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances Horticulture Science**, v.8, p.171-175, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

CANTANHÊDE, I.S.L.; RODRIGUES, E.F. Uso de BAP (6-benzilaminopurina) e água de coco na organogênese de maracujá (*Passiflora edulis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:SBF, 2004, p. 15.

CAO, K.-F.; GUO, Y.-H.; CAI, Z.-Q. Photosynthesis and antioxidant enzyme activity in breadfruit, jackfruit and mangosteen in Southern Yunnan, China. **Journal Horticultural Science & Biotechnology**, v.81, n.1, p.168-172, 2006.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CHOUDHURY, N.K.; BEHERA, R.K. Photoinhibition of photosynthesis. Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. **Photosynthetica**, v.39, n.4, p.481-488, 2001.

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

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, M. G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, n.7, p.1023-1028, 1993.

DHINDSA, R.S.; PLUMB-DHINDSA, P.; THORPE, T.A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, v.32, p.93-101, 1981.

DICHIO, B.; ROMANO, M.; UNZO, V.; XILOYANNIS, C. Soil water availability and relationship between canopy and roots in young olive trees (cv. Coratina). **Acta Horticulture**, v.586, p.255-258, 2002.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, n.7, p.1276-1277, 1997.

FELISMINO, C.F. **Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade**. 2005. 112p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares e hipocotiledonares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, 670 p.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica do Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLUHR, R.; MATTOO, A.K. Ethylene – Biosynthesis and perception. **Critical Review in Plant Sciences**, v.16, n.5-6, p.479-523, 1996.

GAHAN, P.B.; WANG, L.; BOWEN, I.D.; WINTERS, C. Cytokinin-induced apoptotic nuclear changes in cotyledons of *Solanum aviculare* and *Lycopersicon esculentum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, n.3, p.237-245, 2003.

GIANNOPOLITIS, C.N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, n.2, p.309-314, 1977.

GONÇALVES, K.S.; JUNGHANS, T.G.; VIDAL, A.M.; SOUZA, A. do S. Efeito residual do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* do maracujazeiro amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:SBF, 2004, p. 15.

HAVAUX, M. Carotenoid as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends in Plant Science**, v.126, p.485-493, 2001.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.2, p.450-455, 1987.

HEATON, J.H.; MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissue. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.8-15, 1996.

JONA, R.; CASTRO, A.; TRAVAGLIO, D. The climateric feature of fruits is reflected in the sensitivity of ethylene of plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.94, p.273-284, 2002.

JOUNG, Y.H.; LIAO, M.S.; ROH, M.S.; KAMO, K.; SONG, J.S. In vitro propagation of *Campanula glomerata*, 'Acaulis' from leaf blade explants. **Scientia Horticulturae**, v.92, p.137-146, 2002.

JUNGHANS, T.G.; VIDAL, A.M.; SOUZA, A. da S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém:SBF, 2002, p.1-5.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.2, 1999, p.869.

KUREPIN, L.V.; WALTON, L.J.; REID, D.M.; PHARIS, R.P.; CHINNAPPA, C.C. Growth and ethylene evolution by shade and sun ecotypes of *Stellaria longipes* in response to varied light quality and irradiance. **Plant, Cell and Environment**, v.29, p.647-652, 2006.

KWA, S-H.; WEE, Y-C.; KUMAR, P.P. Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities of photoautotrophic callus of *Platyserium coronarium* (Koenig ex O.F. Muell.) Desv. under CO₂ enrichment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.75-82, 1987.

LAI, C-C.; YU, T-A.; YEH, S-D.; YANG, J-S. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p.221-225, 1998.

LOPES, D.B.; BENTO, D. de M.; BARROSO, P.V.; MACEDO, C.E.C.; ALLOUFA, M.A.I. Efeitos dos antibióticos rifampicina e cefotaxima no desenvolvimento de calos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:SBF, 2004, p.15.

LU, Q.; WEN, X.; LU, C.; ZHANG, Q.; KUANG, T. Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.749-754, 2003.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efectos de la luz sobre la germinación de la parchita. **Agronomía Tropical**, v.47, n.4, p.397-408, 1997.

MAGDALITA, P.M.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.93-100, 1997.

MARTINEZ, C.A.; MOREIRA, M.; TORGGLER, B.; FAVARETTO, V.; HILDEBRAND, H. Photoinhibition of photosynthesis in tropical tree species of differing succession status: a chlorophyll fluorescence study. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.

MATILE, P. Biochemistry of Indian Summer: physiology of autumnal leaf coloration. **Experimental Gerontology**, v.35, p.145-158, 2000.

MEHLHORN, H.; LELANDAIS, M.; KORTH, H.G.; FOYER, C.H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidation. **FEBS Letters**, v.378, p.203-206, 1996.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f.

flavicarpa Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.527-531, 2000.

MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, v.33, n.10, p.693-699, 1978.

MORAN ROBLES, M.J. Potential morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture “*in vitro*”. **Turrialba**, v.29, n.3, p.224-228, 1979.

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

PARKIN, K.L.; MARANGONI, A.; JACKMAN, R.; YADA, R.; STANLEY, D. Chilling injury. A review of possible mechanisms. **Journal of Food Biochemistry**, v.13, p.127-153, 1989.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociencia & Desenvolvimento**, n.25, março/abril, p.44-48, 2002.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; ČATSKÝ, J.; WILHELMOVÁ, N. a; ŠRÁMEK, F. Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tabacco plantlets to *ex vitro* conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.330, p.119-126, 1999.

POWLES, S. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p.15-44, 1984.

QUILES, M.J.; LOPEZ, N.I. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant growth – Effects on the chloroplasts NADH dehydrogenase complex. **Plant Science**, v.166, p.815-823, 2004.

RASKIN, I.; BEYER JUNIOR, E.M. Role of ethylene metabolism in *Amaranthus retroflexus*. **Plant Physiology**, v.90, p.1-5, 1989.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; TOLEDO PRICOLI, E.A.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.39, p.618-622, 2003.

RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.237-241, 2002.

SEPPANEN, M.M.; FAGERSTEDT, K. The role of superoxide dismutase activity in response cold acclimation in potato. **Physiologia Plantarum**, v.108, p.279-285, 2000.

SHANG, W.; FEIERABEND, J. Dependence of catalase photoinactivation in rye leaves on light intensity and quality and characterization of a chloroplast-mediated inactivation in red light. **Photosynthesis Research**, v.59, p.201-213, 1999.

SHIMIZU, N.; KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K. The reaction of superoxide radical with catalase. **Journal of Biology Chemistry**, v.259, p.4414-4418, 1984.

SITBON, F.; HENNION, S.; LITTLE, C.H.A.; SUNDEERG, B. Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition. **Plant Science**, v.141, p.165-173, 1999.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society Experimental Biology**, v.11, p.118-231, 1957.

SOFO, A.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; MASIA, A. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. **Functional Plant Biology**, v.32, p.45-53, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.DEA.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L.DE. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.

THAN THANH VAN, M. Direct flower neoforation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.115, p.87-92, 1973.

TOTOLA, M.R. **Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperatura supra-ótima**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, v.2, p.231-244, 1951.

YE, L.; GAO, H.-.; ZOU, Q. Responses of the antioxidant systems and xanthophyll cycle in *Phaseolus vulgaris* to the combined stress of high irradiance and high temperature. **Photosynthetica**, v.38, n.2, p.205-210, 2000.

Estresse foto-oxidativo durante o crescimento *in vitro* de ápices caulinares de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, sob diferentes irradiâncias

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento *in vitro* de ápices caulinares do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, bem como a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e o nível de malondialdeído (MDA) em plântulas crescidas sob diferentes irradiâncias. O experimento foi instalado em delimitação inteiramente casualizada, totalizando cinco tratamentos, com dez repetições. Os tratamentos foram os cinco níveis de irradiância (12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Verificou-se, com o aumento dos níveis de irradiância, redução no crescimento dos ápices caulinares e também no número de folhas, massa da matéria fresca e seca da parte aérea. Os ápices caulinares tiveram maiores porcentagens de enraizamento nas irradiâncias de 12, 25, 50 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (em torno de 90,0%) se comparado à de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (75,0%). A elevação dos níveis de irradiância fez aumentar a atividade das enzimas SOD e POD até 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto acima desse nível, houve queda da atividade. O contrário foi observado com a CAT, cuja elevação dos níveis de irradiância fez aumentar a atividade dessa enzima. O mesmo foi observado com o conteúdo de MDA. As maiores irradiâncias favoreceram a elevação nas taxas de etileno e CO_2 . Esse aumento nos teores de etileno *in vitro* contribuiu para a redução nos teores dos pigmentos cloroplastídicos. Portanto, os ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* desenvolveram-se melhor debaixo das menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

1. INTRODUÇÃO

Nos trabalhos realizados por Alexandre (2002), Couceiro (2002) e Felismino (2005) sobre propagação *in vitro* do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, observou-se que sementes dessa espécie, quando colocadas para germinar *in vitro*, no escuro, produziram plântulas axênicas apresentando inicialmente ápices caulinares do hipocótilo em forma de gancho e estando os primórdios foliares envolvidos por restos do endosperma. Esta condição foi observada como persistente por até 30 dias após a germinação, dificultando a emergência ou abertura das folhas cotiledonares, fator de fundamental importância para o desenvolvimento das plântulas. No entanto, vale realçar que as plântulas, entre 12 e 21 dias, são utilizadas para extração de explantes do tipo ápices caulinares (epicótilo) e segmentos hipocotiledonares.

Supõe-se que tal anomalia possa estar relacionada a algum tipo de estresse, como por exemplo, estresse foto-oxidativo.

A fotoinibição é um conjunto complexo de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese por excesso de luz (Taiz & Zeiger, 2004). Em plantas de milho fotoinibidas, observaram que, sob alta irradiância, ocorreu perda parcial da atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e que são ativadas por luz (Powles et al., 1982).

Existe uma série de produtos fototóxicos resultantes do excesso de fótons que não são utilizados durante a fotossíntese, como a clorofila no estado triplete ($^3\text{Ch}^*$), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2^*$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e o superóxido (O_2^-). O superóxido é uma das espécies reativas do oxigênio (ROS), consideradas muito prejudiciais às membranas biológicas. Os superóxidos, assim formados, são passíveis de eliminação pela ação de uma série de enzimas, incluindo a superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (Asada, 1999).

Em condições fisiológicas normais (não estressantes) a produção de ROS (H_2O_2 e O_2^-) pelos peroxissomos, deveria ser controlada adequadamente por catalase e ascorbato peroxidase. A catalase é uma enzima inativada por luz e outras condições estressantes (Schfer & Feierabend, 2000), podendo conduzir aumento na geração de H_2O_2 e O_2^- pelos peroxissomos (del Rio et al., 1992, 1996). Radicais superóxidos

inibem a atividade da catalase (Kono & Fridovich, 1982). Em plantas de tabaco o ON e peroxinitrito (ONOO^- , espécie reativa de nitrogênio), além de inibir a atividade da catalase, também promove a inibição da ascorbato peroxidase (APX), que são enzimas responsáveis pela remoção de H_2O_2 nos peroxissomos (Clark et al., 2000). Em células animais, observaram que o aumento na síntese de ON promoveu aumento na β -oxidação peroxissomal, resultando na produção de H_2O_2 . Esses resultados indicam que, dependendo do estresse a que as plantas estejam submetidas, ou seja, abiótico ou biótico, ocorre indução na produção peroxissomal de O_2^- e ON. Isto pode conduzir à inibição da atividade da catalase e APX e aumento de H_2O_2 pelo aumento da β -oxidação. Esse desarranjo das defesas antioxidantes dos peroxissomos originaria uma superprodução de H_2O_2 nos peroxissomos, resultando em efeito tóxico para a célula.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de alguns fatores do estresse foto-oxidativo durante o crescimento de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fase de obtenção das plântulas axênicas

As sementes foram extraídas de frutos maduros e colhidos de uma única planta de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, procedente do pomar do Setor de Fruticultura, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em condições laboratoriais e mediante uso de uma peneira de malha fina, o arilo das sementes foi removido, pressionando-as cuidadosamente, depois de envolvê-las em cal extinta. Em seguida, as sementes foram lavadas em água de torneira até completa remoção da cal e restos placentários. À continuação, foram submetidas a secagem à sombra, sobre papel toalha, por três dias. Após o processo de secagem, procedeu-se o preparo das sementes. O tegumento externo (episperma) foi completamente removido com auxílio de uma mini-morsa.

As sementes, assim preparadas, foram desinfestadas sob condições de câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foram submetidas por 1 minuto em solução de etanol a 70%

(v/v), seguido de três enxaguaduras; e logo após, imersas em solução de hipoclorito de sódio com 2,4% de cloro ativo do produto comercial Candura[®], durante 20 minutos e, posteriormente, enxaguadas por três vezes em tempos de 1 minuto, sob agitação constante em água desionizada e autoclavada.

O meio de cultivo das sementes foi constituído dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White (1951), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8,0 g L⁻¹ de ágar (Isofar[®]), como agente solidificante. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar. Alíquotas de 10 mL deste meio foram distribuídas por tubo de ensaio (25 x 150 mm). Os tubos, contendo o meio foram fechados com tampas de propileno transparentes e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

As sementes foram semeadas no meio de cultivo, uma por tubo de ensaio. Após o semeio, os tubos foram fechados como já descrito anteriormente, acondicionados em grades que foram envolvidas com papel alumínio e transferidos para a sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente 60%. O papel alumínio foi utilizado para proteger as sementes contra luz, já que são classificadas, como fotoblásticas negativas por Maciel & Bautista (1997).

O período de incubação foi de 12 dias, tempo suficiente para obter as plântulas axênicas e com tamanho suficiente para obtenção dos ápices caulinares.

2.2. Fase de cultivo dos ápices caulinares

O meio de cultivo para ápices caulinares apresentou a mesma constituição química e o mesmo modo de preparação daquele já descrito para a germinação de sementes. Utilizou-se inclusive, o mesmo tipo de frasco de cultivo e que recebeu a mesma alíquota de 10 mL de meio de cultura. A exceção foi o agente geleificante, que para o cultivo de ápices caulinares foi o Gelrite (Merck[®]) a 2,5 g L⁻¹ de meio.

Os ápices caulinares, excisados com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, foram plantados em condições de câmara de fluxo laminar, na orientação vertical em tubos de ensaio, que foram fechados com duas camadas de filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Os tubos de ensaio, contendo os explantes, foram incubados em sala de crescimento, distribuídos nas prateleiras das estantes, à distância de aproximadamente 5 cm entre si, de forma a não proporcionar sombra nos mesmos, com controle de temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiâncias de 12; 25; 50; 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes OSRAM®, com potência de 40 W, luz do dia. O modo pelo qual os ambientes espectrais foram conseguidos acha-se descrito no Capítulo III.

O período de incubação foi de 42 dias.

2.3. Características avaliadas

2.3.1. Análise de crescimento

A partir de cada ápice caulinar, foi avaliado o índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de emergência dos cotilédones; porcentagem de abscisão do nó e da folha cotiledonar; altura de plantas (cm); área foliar (cm^2); número de folhas; número e comprimento de raiz; porcentagem de enraizamento; massa da matéria fresca e seca de parte aérea (mg).

2.3.2. Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD EC1.11.1.7), catalase (CAT EC1.11.1.6) e superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1)

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade da peroxidase, catalase e superóxido dismutase foi obtido pela homogeneização de 0,5 g da parte aérea de plântulas do maracujazeiro (congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C) com 4 mL de solução de extração (EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8), em almofariz de porcelana. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 12000 g por 20 minutos, utilizando o sobrenadante como fonte de proteínas, de acordo com metodologia descrita por Saher et al. (2004). Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4 °C.

2.3.2.1. Peroxidase (POD EC1.11.1.7)

A atividade de PODs nas partes aéreas foi determinada espectrofotometricamente a 25 °C, pelo aumento da absorvância a 470 nm, a partir da reação de 100 µL do extrato enzimático bruto diluído a 1:4 (v/v) com água desionizada em uma mistura de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5; 0,5 mL de guaiacol e 0,4 mL de H₂O₂ 0,59 M, em um volume total de 3 mL (Chance & Maehley, 1955). Os resultados foram expressos em $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.2.2. Catalase (CAT EC1.11.1.6)

A atividade das CATs nas partes aéreas foi determinada após a adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação, constituído de 500 µL de H₂O₂ 59 mM; 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e 400 µL de água desionizada a 30 °C (Havir & McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de 0,3 mL de metionina 130 µM; 0,1 mL de azul de p-nitrotetrazólio (NBT) 2250 µM; 0,1 mL de EDTA 3 µM; 0,2 mL de riboflavina; 0,75 mL de água desionizada e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,8 (Del Longo et al., 1993), adicionaram-se 100 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C, em tubos de ensaio dispostos em orifícios equidistantes de um tubo fluorescente de 15 W, colocado no centro de uma câmara de incubação circular e foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente. Após 15 min, o desligamento do tubo fluorescente interrompeu a reação, sendo a produção de formazana azul medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraído de um “branco”, no qual não havia extrato enzimático. Nestas condições, uma unidade de SOD

foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Giannopolitis & Ries, 1977; Totola, 1998).

2.3.2.4. Quantificação de proteínas

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão.

2.3.3. Determinação do teor de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica nas plântulas foi expressa como teor de malondialdeído (MDA), determinado pelo método de TBARS (Buege & Aust, 1978). Amostras de tecidos dessas estruturas (100 mg de matéria fresca) foram homogeneizadas em 5,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PMF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Retirou-se do sobrenadante uma alíquota de 1,0 mL adicionando 4,0 mL da mistura contendo 10% (p/v) de TCA e 0,5% de TBA, contendo 0,01% de BHT (butilhidroxitolueno). Em seguida, os tubos de ensaio contendo a mistura foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. O “branco” foi preparado sem a amostra, porém seguindo todas as outras etapas. A absorvância do sobrenadante foi lida a 535 nm e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Dhindsa et al. (1981), conforme a seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\zeta \cdot b)$, onde, ζ (coeficiente de extinção) = $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e b (comprimento ótico) = 1 cm.

2.3.4. Produção de etileno (C₂H₄) e dióxido de carbono (CO₂)

Para a avaliação do acúmulo de etileno e CO₂, cada tratamento constituiu-se de 36 tubos de ensaio, contendo cada uma plântula, que de 7 em 7 dias, 6 destes tubos de cada tratamento foram tomados, para a determinação dos gases. Os tubos de ensaio foram abertos em câmara de fluxo laminar por 30 minutos e novamente vedados com duas camadas de filme plástico transparente de PVC Rolo-pack[®]. As leituras foram realizadas após 24 horas para cálculo da taxa de produção. Retirou-se dos tubos de ensaio duas amostras dos gases liberados pelos tecidos, com auxílio de seringas, de 1 mL cada; a alíquota amostrada foi injetada em cromatógrafo a gás (Modelo GC – 1413, Shimadzu Kyoto), equipado com detector TCD e FID para determinação das concentrações de etileno e CO₂. As temperaturas da coluna (porapak-Q), do injetor e do detector foram de, respectivamente, 50, 100 e 135 °C.

A taxa de produção de etileno e CO₂ foi expressa em nL C₂H₄ g MF⁻¹ h⁻¹ e mmol CO₂ g MF⁻¹ h⁻¹, respectivamente, segundo as equações: $TX = C \cdot V \cdot t^{-1} \cdot p^{-1}$ e $TX = C \cdot V \cdot 10 \cdot t^{-1} \cdot p^{-1}$, respectivamente, onde C = concentração do etileno e/ou de CO₂ no frasco (nL mL⁻¹ e/ou mmol mL⁻¹, respectivamente); V = volume da fase gasosa (mL); t = tempo de acúmulo (horas); p = massa da matéria fresca (g).

2.3.5. Determinação dos pigmentos foliares

Para a análise dos pigmentos foliares, foram removidas folhas das plântulas formadas e pesadas individualmente até atingirem 0,1 g. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução de 20 mL de dietil éster por 24 horas, em frascos envolvidos com papel alumínio, como forma de proteção contra luz. O extrato foi colocado em uma cubeta de quartzo, realizando-se as leituras em espectrofotômetro UV/VIS digital, marca HITACHI, modelo U-2001, cuja densidade ótica das amostras foi lida a 660,6; 642,2 e 470 nm. Foram determinados os teores de clorofilas a, b e totais e de carotenóides, das relações clorofila a/b e carotenóides/clorofilas.

2.3.6. Análise de cor

Para a avaliação da cor utilizou-se colorímetro de triestímulos COLOR QUEST II e o software Universe da Hurterlab, Reston, VA, sob o iluminante D nos sistemas de cor de Hunter com os parâmetros L, a, b; onde L representa a luminosidade, que caracteriza o grau de claridade da cor; +a, o vermelho; -a, o verde; +b, o amarelo; -b, o azul.

Nas medições de cor, o material organogênico (gemas e brotos, 0,1 g), foi incubado em solução de 20 mL de dietil éster por 24 horas, em frascos envolvidos com papel alumínio, como forma de proteção contra luz. O extrato foi colocado em uma cubeta de quartzo de 80:60:15 mm, realizando-se as leituras. Com os valores obtidos nas leituras das coordenadas a e b, foram calculados os valores da tonalidade ou nuança, $h = \arctg(b/a)$ e da saturação da cor ou croma, $C = \sqrt{a^2 + b^2}$. A saturação ou cromaticidade da cor é a qualidade que caracteriza a quantidade de cor, indicando os níveis em que está misturada com o branco, o preto ou o cinza. A tonalidade da cor ou matiz é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor, o que possibilita a diferenciação das cores.

2.4. Delineamento experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições (16 tubos de ensaio), onde os tratamentos foram os 5 níveis de irradiância, sendo a parcela experimental constituída de um ápice caulinar cultivados na posição vertical.

3. RESULTADOS

Os resultados da avaliação do índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de emergência dos cotilédones de sementes do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* podem ser vistos na Figura 1A.

As maiores velocidades de emergência dos cotilédones de dentro dos restos do endosperma ocorreram nas irradiâncias de 100, 50 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nesta ordem

(Figura 1Aa). E as maiores porcentagens de emergência aconteceram nas irradiâncias de 50 (48,43%), 100 (46,87%) e 150 (43,75%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1Ab).

Os aspectos morfológicos do ápice caulinar, caracterizado como sendo o extremo distal do hipocótilo, podem ser vistos na Figura 1B.

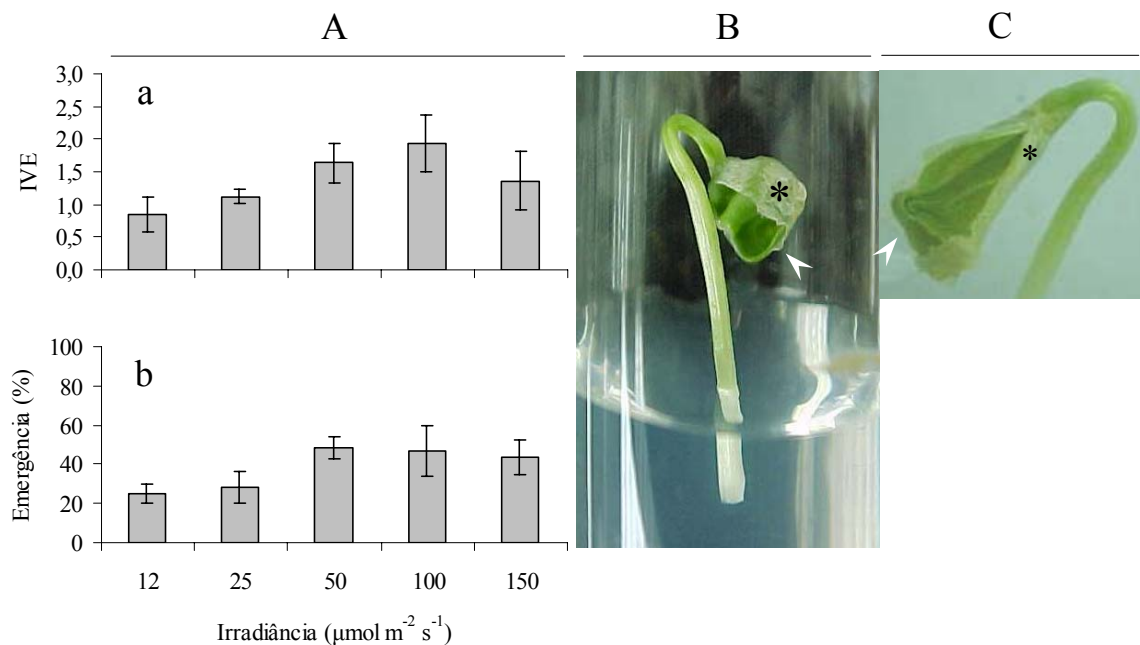


Figura 1. (A) Índice de velocidade de emergência (IVE, a) e emergência (%), b) dos cotilédones de sementes de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* plantados *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância; (B) Ápice caulinar mostrando a abertura do nó cotiledonar, indicado pela seta e detalhe do nó cotiledonar, mostrando o início da emergência das folhas cotiledonares, através do rompimento dos restos do endosperma (asterisco); (C) Detalhe do nó cotiledonar mostrando a abertura do nó cotiledonar. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

Sinais de estresse, como abscisão do nó e das folhas cotiledonares, bem como clorose das folhas e do ápice caulinar podem ser visualizados nos explantes cultivados nas irradiâncias de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 2 Ba, Bb e Bc, respectivamente). Nessa ordem de ambiente espectral, se estabeleceu um gradiente crescente no nível de clorose das folhas. Na irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi identificado, ainda, ao longo do ápice caulinar, enrugamento do tecido, característico de perda da turgescência celular, sinalizando uma senescência precoce.

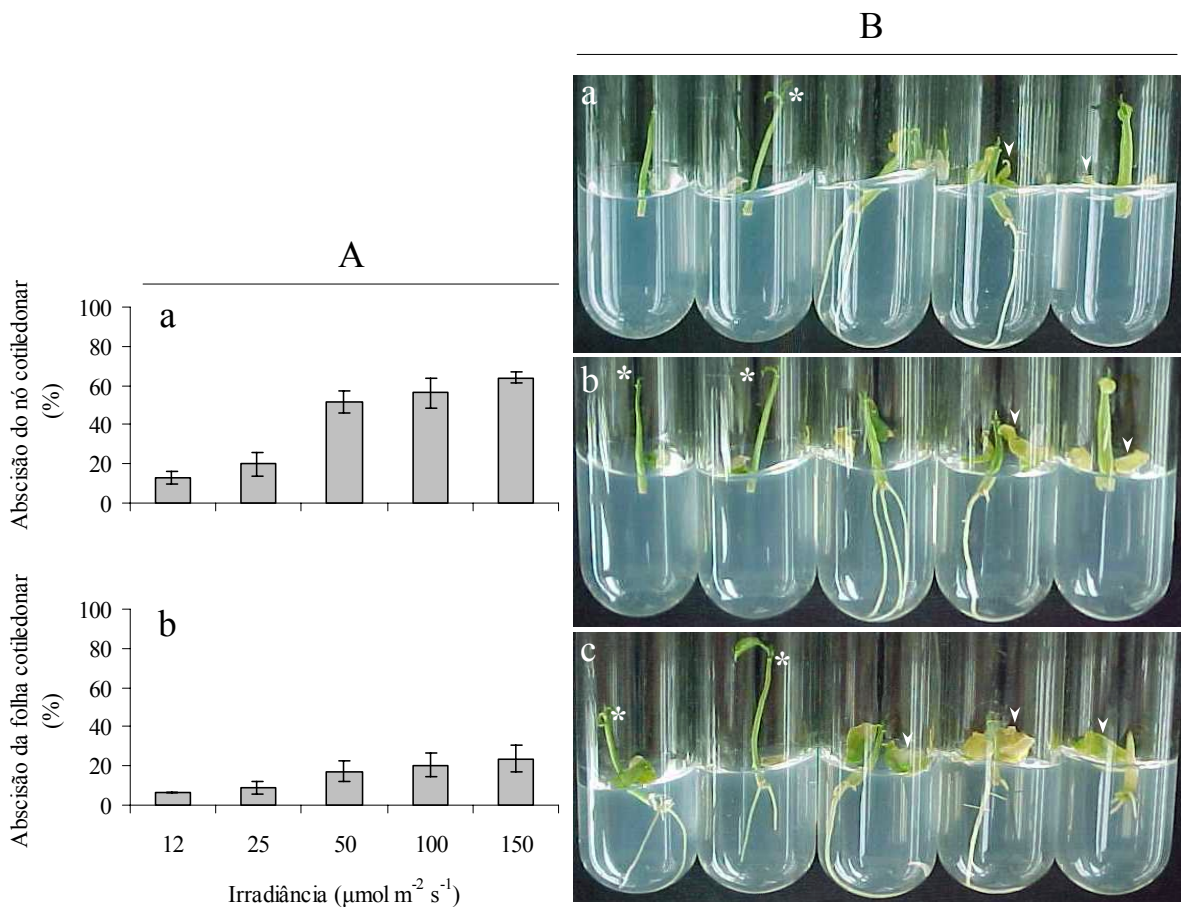


Figura 2. (A) Abscisão do nó cotiledonar (%), a) e das folhas cotiledonares (%), b) dos ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância; (B) Sinais de estresse, como abscisão do nó e das folhas cotiledonares e clorose das folhas (seta) e do ápice caulinar. O asterisco (*) representa a emissão de novas folhas. Legenda: a) 50; b) 100; c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

As maiores porcentagens de abscisão do nó cotiledonar aconteceram nas irradiâncias de 50 (51,5%), 100 (56,2%) e 150 (64,0%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2Aa). Comportamento semelhante foi observado para a porcentagem de abscisão das folhas cotiledonares, sendo esta de 17,0%, 20,0% e 23,0% nas respectivas irradiâncias de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2 Ab). A abscisão do nó cotiledonar não comprometeu, inicialmente, a sobrevivência do ápice caulinar, pois em seguida houve a emergência de folhas, indicando o restabelecimento do explante. Entretanto, essas novas folhas, em fase de crescimento, quando expostas a maiores níveis de irradiância, tornaram-se cloróticas e, em alguns casos, com alos translúcidos, comprometendo, o crescimento do ápice caulinar, por influenciar inúmeros processos fisiológicos dentre eles, a fotossíntese.

Observa-se pela Figura 3A que os ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* apresentaram maior crescimento quando cultivados nas duas menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com valores médios de 4,5 e 4,0 cm, respectivamente, para comprimento de parte aérea. Na irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os ápices caulinares alcançaram, em média, 3,8 cm de comprimento. Nos ambientes de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, houve limitação no crescimento dos ápices caulinares. Estes alcançaram valores abaixo de 3 cm de comprimento.

O maior número de folhas formadas foi observado nas plântulas cultivadas sob 12, 25 e 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nestes níveis de irradiância, verificou-se, em média, 4 folhas por plântula. Entretanto, nos ambientes de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, esse número reduziu-se para aproximadamente 3 e 2 folhas por plântula, respectivamente (Figura 3B). A maior área foliar foi encontrada em folhas de plântulas cultivadas nas irradiâncias de 25 e 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3C).

Nas Figuras 3D e E, pode-se observar que tanto a massa da matéria fresca (MMFPA), quanto seca da parte aérea (MMSPA), diminuiu com o aumento dos níveis de irradiância. Esse comportamento da MMFPA e da MMSPA acompanhou o crescimento das plântulas, portanto, o maior crescimento da parte aérea implicou maior biomassa da mesma.

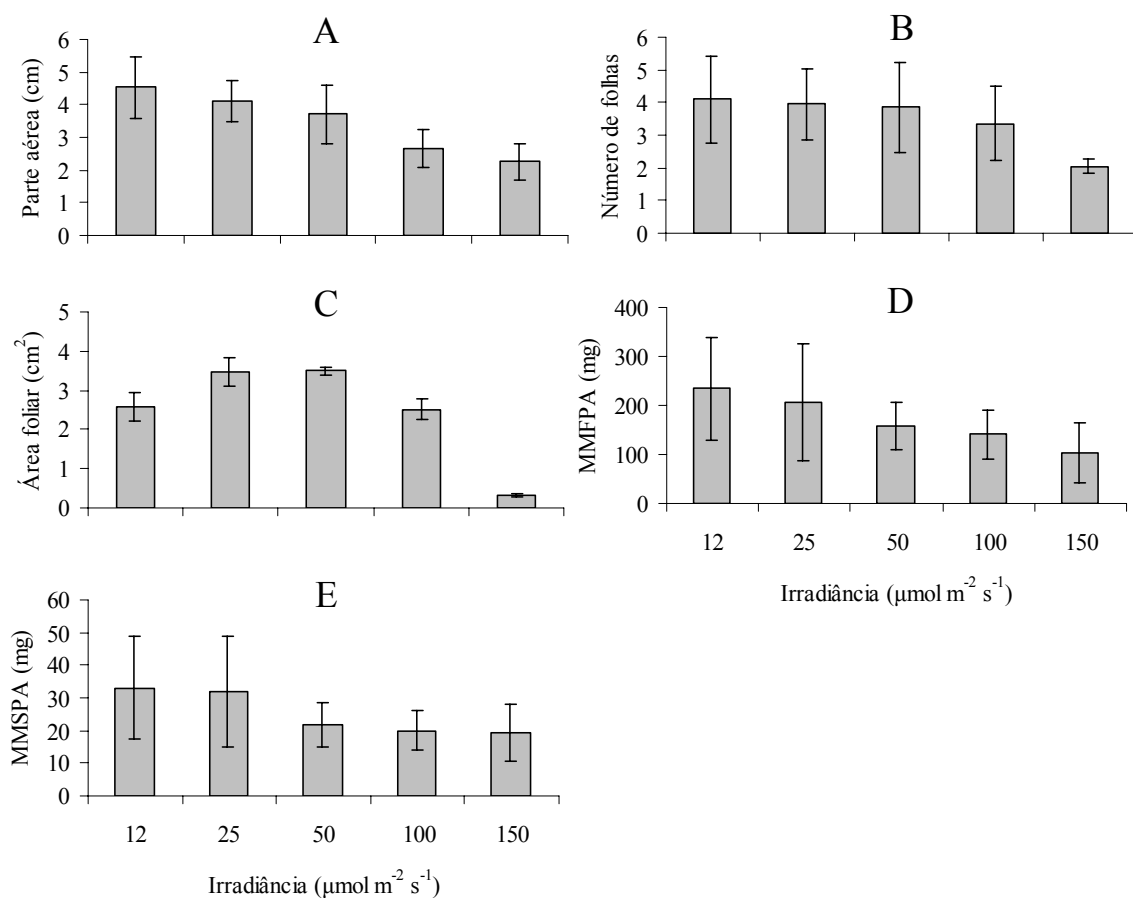


Figura 3. Comprimento da parte aérea (A), número de folhas (B), área foliar (C) massa da matéria fresca (MMFPA, D) e seca (MMSPA, E) da parte aérea de plântulas de maracujazeiro *P. edulis f. flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

A porcentagem de ápices caulinares de maracujazeiro que formaram raízes foi de 90,0% nas irradiâncias de 12 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de 94,6% e 92,18% nas irradiâncias de 25 e 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 4A). Embora para esta variável, a irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tenha apresentado menor resposta (75,0% de ápices enraizados), foi nesse ambiente espectral que os ápices caulinares formaram, em média, maior número de raízes por explante, apesar da elevada variação do número de raízes formadas, observado no desvio-padrão da média desse tratamento (Figura 4B). Esta

resposta se correlaciona com a menor porcentagem (75,0%) de ápices enraizados (Figura 4A). A diferença, quanto a porcentagem de ápices enraizados entre o maior ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o menor ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nível de irradiância foi de, aproximadamente, 20,0%.

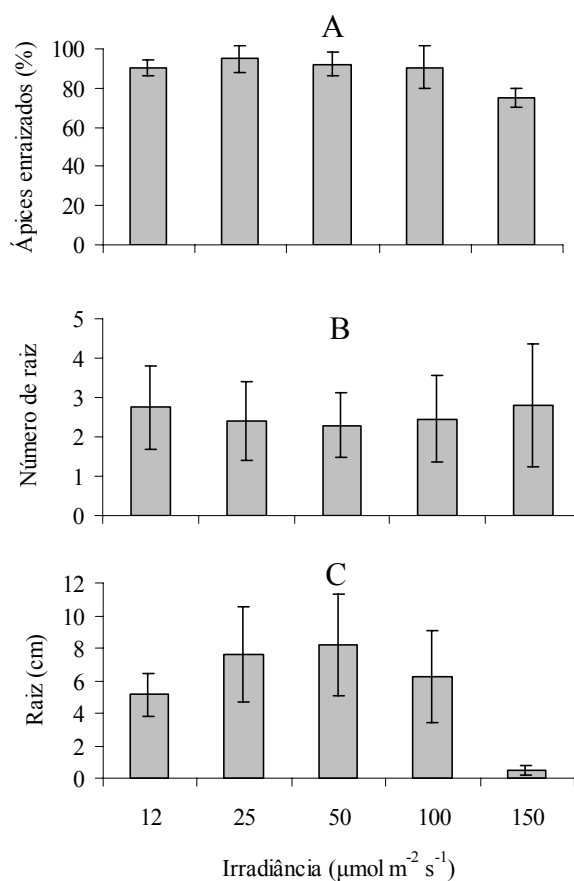


Figura 4. Porcentagem de ápices enraizados (A), número (B) e comprimento de raiz (C) de plântulas de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

Em relação à formação e crescimento das raízes (Figuras 4B e C, respectivamente), verificou-se que o nível de irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ possibilitou

a emissão, mas não o alongamento das raízes, ou seja, neste ambiente as raízes formadas sequer atingiram 0,5 cm de comprimento. Apesar de nesse ambiente espectral o número de raízes, por ápice caulinar, em média, ter sido maior, em todos os outros níveis de irradiância estudados, esse número foi em torno de duas (Figura 4B). Tanto a menor ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), quanto a maior ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) irradiância, tiveram baixa eficiência quanto a capacidade de estimular o alongamento radicular, principalmente a maior irradiância (Figura 4C).

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) aumentou nos tecidos das plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, após 42 dias de cultivo dos ápices caulinares, com a elevação dos níveis de irradiância até $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a atividade dessas enzimas foi menor (Figura 5).

Comportamento contrário foi observado para com a enzima catalase (CAT). A atividade dessa aumentou com a elevação dos níveis de irradiância (Figura 5). Isto demonstrou haver requerimento desta enzima em tecidos dessa espécie, quando os ápices caulinares foram expostos à irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A atividade da CAT em plântulas cultivadas neste ambiente foi a mais elevada. Nos demais ambientes espectrais, a atividade da CAT foi menor se comparado a irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, nas irradiâncias de 100, 50 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a atividade dessa enzima foi ainda superior, respectivamente, se comparado à irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 0% ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 29,23% ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 16,53% ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) superior, se comparado à menor irradiância ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as plântulas cultivadas apresentaram atividade da SOD e POD abaixo do observado nas demais irradiâncias, inclusive dos ápices caulinares cultivados debaixo do menor nível de irradiância ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 5).

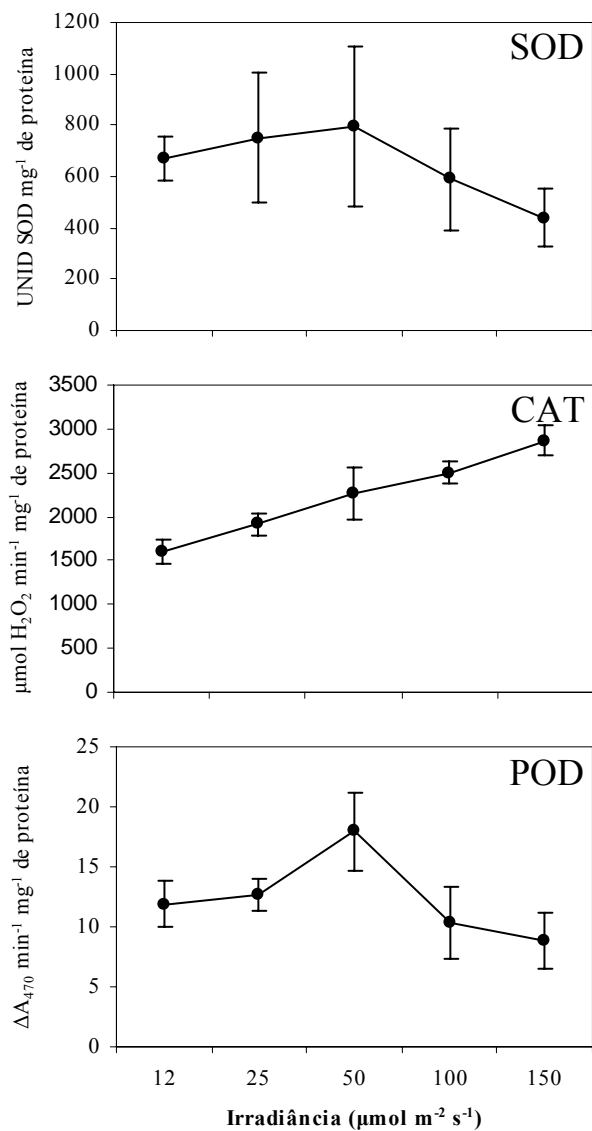


Figura 5. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

Na Figura 6, verifica-se com a elevação dos níveis de irradiância, aumento do conteúdo de malondialdeído (MDA) nos tecidos das plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*. A nível celular, a formação de maiores

quantidades dessa substância é decorrência da peroxidação de lipídios (lipoperoxidação), reação esta em cadeia e que inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular, culminando com a formação de radicais altamente reativos, dentre eles o radical hidroxila (OH^\cdot), considerado o principal agente causador da lipoperoxidação.

Ápices caulinares cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sintetizaram os maiores teores de MDA ($78,3 \text{ nmoles gMF}^{-1}$), que àqueles produzidos nos ápices caulinares cultivados sob $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($38,52 \text{ nmoles}$) (Figura 6). Nas irradiâncias de 50 e de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os teores de MDA produzidos pelos ápices caulinares foram, respectivamente, de 49,22 e 68,0 nmoles (Figura 6). Por outro lado, a diferença do conteúdo de MDA produzido na irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi de apenas 0,98 nmol para mais (Figura 6).

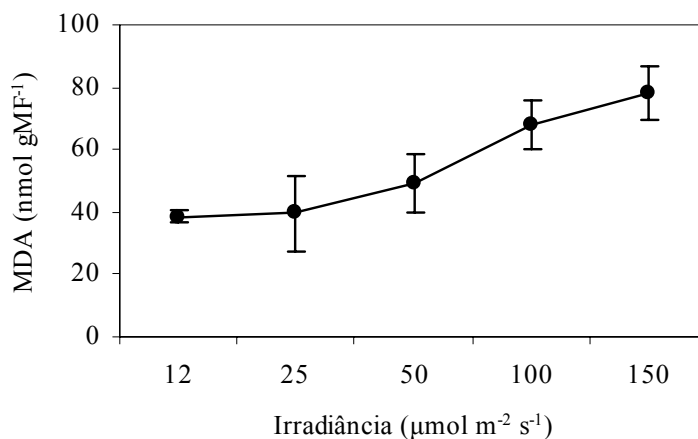


Figura 6. Peroxidação de lipídios (teor de MDA) em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

A maior produção de etileno foi verificada aos 7 dias de cultivo independente dos níveis de irradiância em que os explantes foram expostos. A produção desse gás foi aumentada, à medida que elevou-se os níveis de irradiância. As taxas de emissão do

etileno foram de 83,96; 94,85; 148,13; 228,20 e 235,27 nL C₂H₄ gMF⁻¹ h⁻¹ nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹, respectivamente (Figura 7).

Aos 14 dias, o comportamento dos explantes com relação à produção de etileno foi o contrário do observado aos 7 dias de cultivo. A menor produção de etileno pelos explantes foi verificada no ambiente de 150 μmol m⁻² s⁻¹. Por exemplo, os explantes cultivados por 14 dias nessa irradiância, apresentaram taxa de produção desse gás um sexto menor, quando comparado a produção aos 7 dias. A partir do 21º dia não houve praticamente produção considerável desse gás (Figura 7).

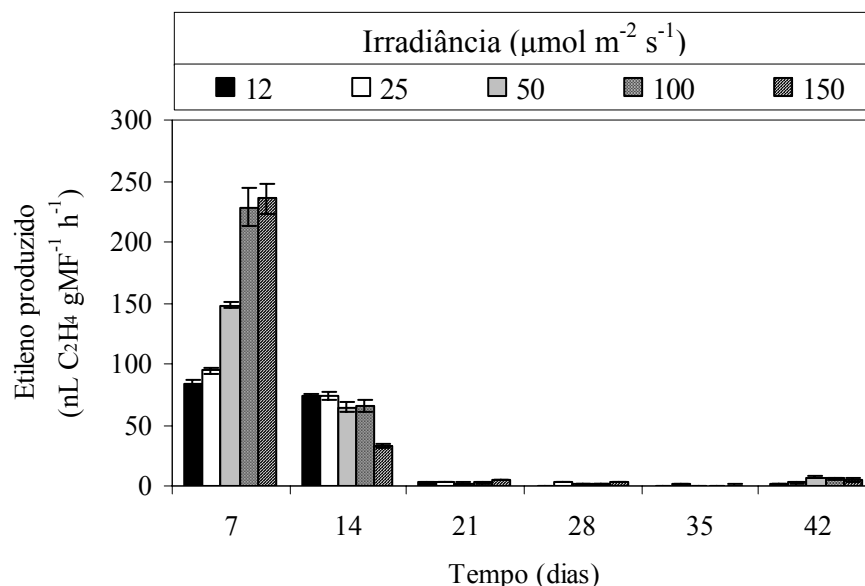


Figura 7. Produção de etileno pelas plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias do cultivo nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

A produção de CO₂ também foi influenciada pelos diferentes níveis de irradiância estudados. As irradiâncias mais elevadas como a de 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹ estimularam a maior produção de CO₂, aos 7 e 14 dias de cultivo desses explantes. Aos 21 dias de cultivo dos segmentos hipocotiledonares, houve queda substancial na

produção desse gás em todos os níveis de irradiância, de forma que aos 28, 35 e 42 dias a produção decresceu a níveis baixos (Figura 8).

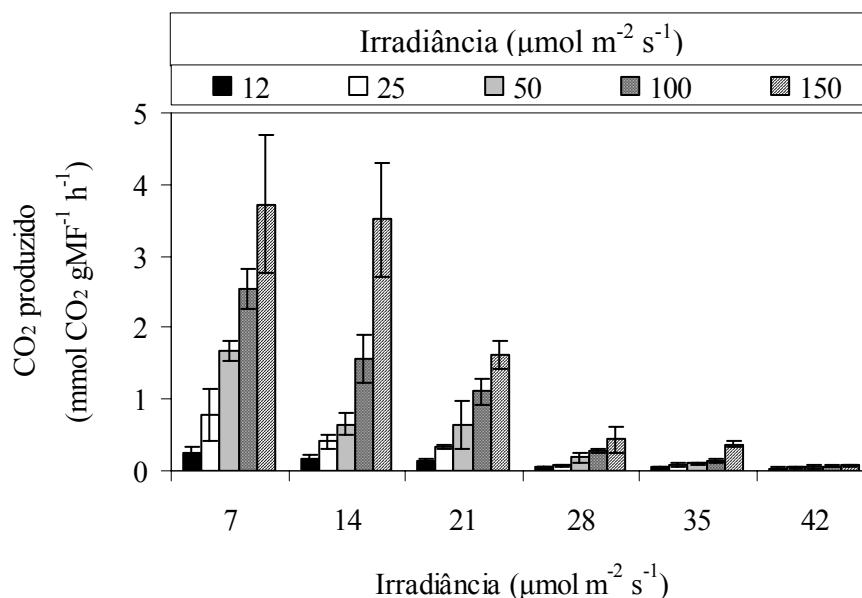


Figura 8. Produção de CO₂ pelas plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias do cultivo nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 µmol m⁻² s⁻¹. As barras correspondem ao desvio-padrão da média.

Na Figura 9, observa-se comportamento decrescente dos pigmentos de clorofila a, b, total e carotenóides com a elevação dos níveis de irradiância. O maior teor de clorofila a, b, total e carotenóides foi encontrado na irradiância de 12 µmol m⁻² s⁻¹ (Figuras 9A, B, C e D, respectivamente). Na irradiância de 150 µmol m⁻² s⁻¹, os valores de clorofila a, b, total e carotenóides se aproximaram muito do valor zero, indicativo de degradação desses pigmentos cloroplastídicos (Figuras 9A, B, C e D, respectivamente).

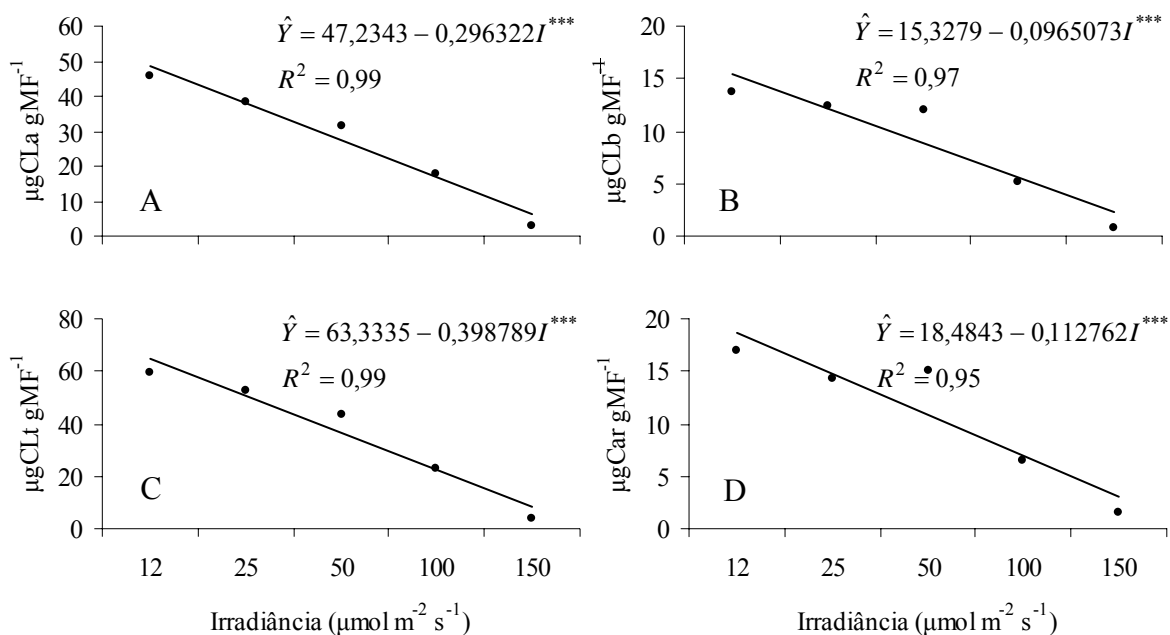


Figura 9. Teores de clorofilas a (A), b (B), total (C) e carotenóides (D) e as relações clorofila a/b (E) e carotenóides/clorofilas (F), em estruturas organogênicas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, obtidas nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 42 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo.

***Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

Na Figura 10A, B e C, respectivamente, tem-se a estimativa do comportamento das coordenadas “L”, “a” e “b” nas folhas das plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro* nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os valores da coordenada “L” aumentaram proporcionalmente com a elevação dos níveis de irradiância. Com isso, observou-se maior brilho, ou maior, reflexão da luz, em folhas de plântulas cultivadas sob as maiores irradiâncias (Figura 10A).

Menores valores da coordenada “a” indicam folhas mais verdes. Neste caso, as folhas das plântulas cultivadas nas irradiâncias de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram folhas mais verdes que aquelas cultivadas nas demais irradiâncias (Figura 10B).

O maior valor encontrado para a coordenada “b” foi na irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o menor na irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 10C).

O menor valor de tonalidade encontrado foi na irradiância de 55,63 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o maior valor de saturação na irradiância de 19,97 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 10 D e E, respectivamente).

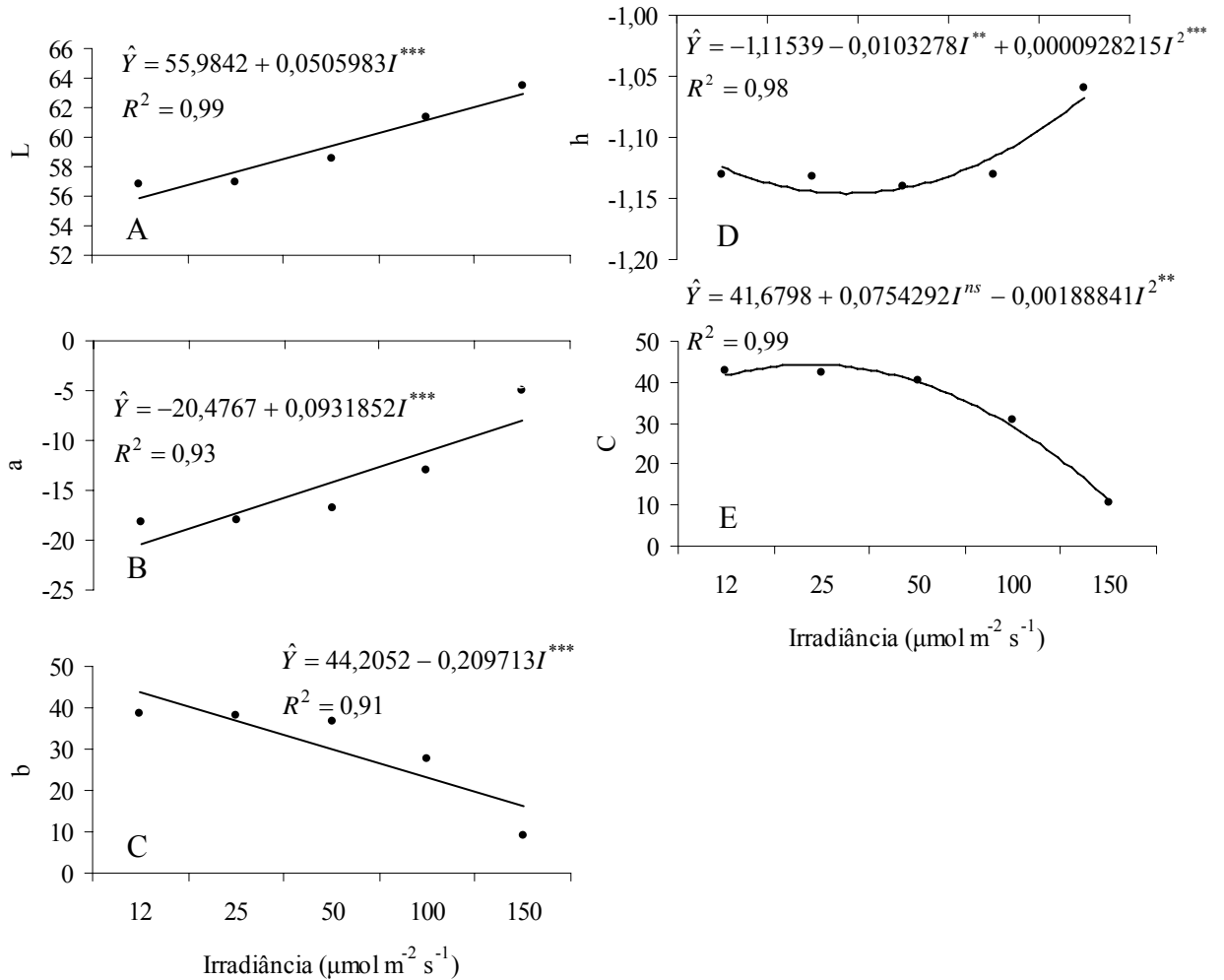


Figura 10. Medidas das coordenadas L (A), a (B), b (C), tonalidade (h, D) e saturação da cor (C, E) pelo sistema de cor de Hunter em extratos de tecidos da parte aérea de plântulas de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, após 42 dias de cultivo.

ns, ** e *** Não significativo e significativo a 1% e 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

4. DISCUSSÃO

O limiar do desenvolvimento dos ápices caulinares se daria pela emergência das folhas cotiledonares (Figuras 1Ba e 1Bb). Diante dessa hipótese, o nível de irradiância que, por exemplo, aumentasse a velocidade de emergência das folhas cotiledonares, anteciparia o desenvolvimento dos ápices caulinares, encurtando, o tempo para a obtenção das plântulas. Não foi isso que ocorreu, muito embora as maiores irradiâncias tenham proporcionado as maiores velocidades (Figura 1A) e porcentagens de emergência (Figura 1B), aos 42 dias da exposição das folhas a essas irradiâncias. Essas maiores irradiâncias acabaram por induzir a clorose do limbo foliar, seguido da abscisão das folhas (Figura 2B). O menor crescimento dos ápices nos dois maiores níveis de irradiância (100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pode estar relacionado a dois fatores ligados ao estresse fotooxidativo: primeiro, com a abscisão do nó e das folhas cotiledonares, e segundo, que as novas folhas, ao se desenvolverem sob essas maiores irradiâncias, proporcionam a emergência de folhas cloróticas, culminando com o desprendimento fácil do eixo caulinar, característica esta própria de senescência foliar precoce. Não foram identificados, na literatura revisada, trabalhos nesta linha, para confrontar com os dados aqui obtidos.

Nos ambientes espectrais de 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificou-se que, em grande número de ápices caulinares, o nó cotiledonar, ao invés de promover a abertura ou desprender-se com a abscisão, ele simplesmente fissurou-se lateralmente e permitiu a emergência de outras novas folhas, contidas no ápice meristemático.

Ápices caulinares cultivados nos menores níveis de irradiância, como 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, deram origem a plântulas mais alongadas, atingindo $4,0$ e $4,5$ cm de comprimento (Figura 3A). Além disso, nesses dois ambientes, as plântulas produziram mais folhas (Figura 3B) e estas apresentaram maior massa da matéria fresca e seca da parte aérea (Figuras 3D e E, respectivamente). Alexandre (2002) também verificou que os maiores valores de comprimento da parte aérea em ápices caulinares cultivados sob $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, esse autor obteve menor número de folhas formadas (6) e maior área foliar nessa irradiância, enquanto o maior número de folhas formadas (29) e

menor área foliar foi observado naquelas plantas cultivadas no ambiente de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Neste trabalho, ficou evidente que a quantidade de luz incidida sobre os explantes influenciou a porcentagem de ápices caulinares que enraizaram. Isto foi identificado, ao se comparar o comportamento dos explantes cultivados sob $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com os demais níveis de irradiância estudados (Figura 4A). Moran Robles (1978), cultivando brotos axilares de *P. edulis* f. *flavicarpa* no escuro, observou maior porcentagem de enraizamento (11,0%) do que sob luz (7,8%).

O aumento da atividade da SOD até o nível espectral de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5), é indicativo de que a exposição dos ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* ao excesso de energia de excitação pode ser prejudicial ao FSII (Fotossistema II). Isto devido à redução do centro de reação e à produção aumentada das espécies reativas do oxigênio (ROS) nos cloroplastos, dentre elas a geração de radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Por exemplo, del Río et al. (2002) relatam que a produção do radical superóxido nos peroxissomos ocorre na matrix, mediada pela enzima xantina oxidase (XOD) ou na membrana dos peroxissomos pela ação da enzima monodehidroascorbato redutase (MDHAR), sendo neste caso, dependente de NADPH.

Se as reações não específicas de agentes óxido-redutores (como as ROS) não forem controladas por meio de sistemas protetores, como as enzimas que atuam como desintoxicadoras, poderão danificar as biomoléculas, como aquelas produto da peroxidação de lipídios, bem como inativar enzimas e outras proteínas funcionais, além de modificações no DNA da planta (Bartosz, 1997). A atividade das enzimas SOD e POD nas duas maiores irradiâncias (100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Figura 5) pode ser a explicação do exposto acima, relacionando a queda na atividade das enzimas, ao processo de fotoinativação ou degradação das mesmas pelo período prolongado (42 dias) de exposição dos ápices caulinares do maracujazeiro a esses níveis de irradiância.

As SODs catalizam a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Scandalios, 2005). O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio tido como altamente deletério, por participar da reação que produz o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o qual é considerado mais reativo em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\cdot} com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua

alta reatividade. Assim, se o hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes de dissulfetos (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Ferreira & Matsubara, 1997).

Altas irradiâncias poderiam estar envolvidas com a indução da transcrição, que codifica enzimas antioxidantes, H_2O_2 e o estado redox da ascorbato peroxidase (Hernández et al., 2004). Parece que sob altas irradiâncias a produção de ROS é elevada, e assim regula o acúmulo de mRNAs que codificam enzimas antioxidantes (Hernández et al., 2006).

É necessário que ocorra aumento da atividade da CAT, como o observado na Figura 5, com a elevação dos níveis de irradiância, para que a mesma promova a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 , impedindo, dessa forma, sua ação tóxica à bicamada lipídica das membranas celulares (Scandalios, 2005).

Como verificado na Figura 6, o aumento dos níveis de irradiância fez elevar o conteúdo citosólico de MDA, produto este proveniente da peroxidação de lipídios. Cao et al. (2006) verificaram sob elevadas irradiâncias, altas produções de MDA, indicativo de estresse oxidativo. Segundo os autores, plantas que não se mostraram fotoinibidas de forma crônica, apresentaram baixa concentração de MDA e atividades mais altas de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POD). Talvez essa seria a explicação para os menores valores de MDA, sugestionando a habilidade dessas enzimas em metabolizar as espécies reativas de oxigênio. A peroxidação de lipídios e ruptura da membrana plasmática acontece quando a taxa de produção das ROS exceder a capacidade da célula de meabolizar as ROS (Beligni et al., 2002). Segundo Behera & Choudhury (2002), a transferência de plantas para condições de alta irradiância fez elevar o grau de peroxidação de lipídios, principalmente de plantas inicialmente cultivadas sob baixa irradiância. Segundo Mello Filho et al. (1983), os componentes celulares são susceptíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade

na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), conduzindo a morte celular (Ferreira & Matsubara, 1997).

Sintomas como clorose, abscisão foliar, epinastia e hiperhidricidade já haviam sido atribuídos ao acúmulo excessivo de etileno *in vitro* pela espécie *P. mollissima*, sintomas esses que conduziram a necrose e morte do tecido (Bartolo & Macey, 1989).

Jona et al. (2002), ao estudarem o comportamento *in vitro* de algumas espécies quanto ao etileno e sua relação com o padrão climatérico de seus frutos, verificaram que plantas de macieira e pessegueiro são muito sensíveis ao etileno. Isto significa que ambas apresentam comportamento semelhante a de seus frutos. As plantas de videira apresentam comportamento semelhante ao de seus frutos, os quais apresentam padrão não climatérico e, portanto não sensíveis ao etileno. O mesmo foi observado em cerejeira. Entretanto, plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* aumentam a biossíntese de clorofilas com o aumento da síntese de etileno. Segundo os autores, isto significa que em determinadas espécies a sensibilidade ao etileno é maior que em outras.

Reis et al. (2003) verificaram maior taxa de produção de etileno ($0,049 \text{ nmol mL}^{-1} \text{C}_2\text{H}_4 \text{ gMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$) aos 7 dias do cultivo de explantes nodais do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicap*a sob $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiância. Em relação ao controle (0 dias), a produção de etileno, aos 7 dias, foi 51,0% superior. Aos 14 dias, não verificaram emissão de etileno pelos segmentos nodais. Entretanto, aos 21 dias, houve retomada na produção de etileno ($0,011 \text{ nmol}$). Barbosa et al. (2001) verificaram maior produção de etileno (aproximadamente de 80 nL), aos 6 dias de cultivo de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sob irradiância de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Aos 12, 24 e 30 dias, a produção foi abaixo de 50 nL, e aos 18 dias, foi aproximadamente de 50 nL. Entretanto, Crespo et al. (2003) verificaram aos 3 dias de cultivo de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, maior taxa de emissão de etileno, 2,343 ppm, apresentando nas outras leituras tendência de queda.

No presente trabalho, observou-se também maior produção de etileno aos 7 dias de cultivo dos ápices caulinares do maracujazeiro, independentemente do nível de irradiância empregado. Nas irradiâncias de 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a produção foi de 82,96 e 94,85 nL, respectivamente. Todavia, nas irradiâncias de 50 ($148,13 \text{ nL}$), 100 ($228,20$

nL) e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (235,27 nL), verificou-se maiores taxas de emissão do gás. Foram verificadas ainda, aos 14 dias de cultivo, menores taxas de produção de etileno e essa redução acompanhou a elevação dos níveis de irradiância. Os valores obtidos foram de 74,20 nL (12); 74,02 (25); 64,34 nL (50); 64,96 nL (100) e 32,04 nL ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 7). Esses resultados indicam que a luz influencia a taxa de emissão de etileno pelos tecidos das plântulas dessa espécie, e que os ápices caulinares, nos primeiros 7 dias de cultivo (Figura 7), produzem mais etileno quando cultivados sob irradiâncias mais elevadas. Por outro lado, essa maior produção de etileno, inicialmente nas maiores irradiâncias, comprometeu subsequente a emissão do próprio gás, possivelmente pelo seu acúmulo, que influencia negativamente a sua produção. Kurepin et al. (2006) verificaram que a redução no crescimento de brotos do genótipo 1D da espécie *Stellaria longipes* (L.), cultivada sob irradiância de $611 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, acompanhou a evolução no aumento da produção de etileno, de 34,0% em 7 dias e 41,0% em 21 dias. Em contraste, sob irradiância de $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correlacionaram o aumento no crescimento de brotos com as reduções na evolução do etileno. Emery et al. (1994) concluíram que fenótipos de baixa estatura em uma população de plantas desta espécie é produto de seleção, pelo aumento na produção de etileno, em ambientes com níveis altos de irradiância. Kurepin et al. (2006) perceberam em genótipos 7B, certa tendência em aumentar a produção de etileno (embora não-significativa) em ambientes enriquecidos por luz vermelho-distante, enquanto no genótipo 1D o aumento na produção de etileno ocorreu em ambientes enriquecidos com luz vermelha. Pierik et al. (2004) também verificaram aumento na evolução do etileno em ambientes enriquecidos por luz vermelho-distante, em plantas de tabaco.

Os ambientes de maior irradiância (100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) também estimularam os segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* a produzirem mais CO_2 . Crespo et al. (2003) verificaram altas concentrações de CO_2 produzidas por plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa in vitro*. Segundo esses autores, a produção elevada desse gás prejudicou as leituras de etileno.

Ambientes enriquecidos com CO_2 , por longos períodos, podem regular negativamente a fotossíntese de plantas e esta característica pode ser uma consequência da diminuição da densidade estomatal e fechamento parcial de estômatos que reduzem o

transporte de CO₂ para os locais de carboxilação; produção rápida de fotossintetatos que conduz a uma quantidade em excesso de amido nos cloroplastos e inibição da regeneração da fotossíntese; redução na quantidade ou atividade da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Pospíšilová et al., 1999). Kwa et al. (1997) verificaram também que a atividade da Rubisco decresce em calos de samambaia (*Platycerium coronarium*) até 42 dias de cultivo *in vitro*, em ambientes ricos em CO₂.

Morini & Melai (2005) verificaram em irradiâncias de 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que a taxa de emissão de CO₂ por explantes de *Prunus cerasifera* foi maior, se comparado a irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E que nessa maior irradiância (210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a taxa de CO₂ assimilado pelos explantes foi menor que a produzida pela respiração. Neste caso, o CO₂ alcançou o ponto de compensação aproximadamente 305 horas na maior irradiância e 55 horas na menor irradiância. O exposto acima pelos autores pode ajudar na compreensão do presente trabalho, já que nas maiores irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verificou-se os maiores níveis de estresse fotooxidativo.

Como relatado pelos autores acima mencionados, apesar de na irradiância de 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ demorar um pouco mais para que seja atingido o ponto de compensação de CO₂, o problema seria após o equilíbrio entre o CO₂ fixado pela fotossíntese e o produzido pela respiração, com o excesso de irradiância. Segundo Taiz & Zeiger (2004), em fluxos fotônicos mais altos, a resposta fotossintética começa a estabilizar-se e alcançar a saturação. Aumentos posteriores no fluxo fotônico não afetam mais as taxas fotossintéticas, indicando que outros fatores que não a luz incidente, tais como a taxa de transporte de elétrons; atividade da rubisco ou o metabolismo de trioses fosfato tornam-se limitantes à fotossíntese.

A senescência é um evento programado geneticamente, que afeta todos os tecidos vegetais. Várias evidências fisiológicas suportam o papel da ação do etileno e das citocininas no controle da senescência das folhas. O aumento na produção de etileno está associado à perda de clorofila e à descoloração, que são características de senescência foliar (Taiz & Zeiger, 2004). Isso pode ser a explicação da redução dos teores de clorofila a, b, total e carotenóides à medida que elevou-se os níveis de irradiância (Figura 3). Behera & Choudhury (2003) observaram que plantas de trigo apresentaram maior conteúdo de clorofila a e b na irradiância de 15 W m^{-2} , se

comparado as irradiâncias de 30 e 45 W m⁻². Plantas cultivadas inicialmente sob irradiância de 15 W m⁻² apresentaram maior perda de pigmentos do ciclo das xantofilas (16,4%) se comparado àquelas expostas às irradiâncias de 30 W m⁻² (8,4%) e 45 W m⁻² (6,7%) e, posteriormente, transferidas para irradiâncias de 250 W m⁻². Isto indica que as plantas crescidas sob irradiâncias mais altas, quando submetidas a estresse luminoso sofrem menos com a degradação de pigmentos, quando comparadas com aquelas crescidas em ambientes com baixas irradiâncias. Kadleček et al. (2001) observaram em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivadas *in vitro*, sob irradiância de 200 μmol m⁻² s⁻¹, que os conteúdos de clorofila e a relação clorofila a/b foram reduzidos. Kadleček et al. (2003), cultivando essa mesma espécie *in vitro*, porém sob 380 μmol m⁻² s⁻¹, verificaram também redução no conteúdo de clorofila a+b, relação clorofila a/b e aumento no conteúdo dos pigmentos do ciclo das xantofilas.

A maior perda de clorofila em folhas de plântulas do maracujazeiro cultivadas sob irradiâncias de 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹, em comparação à irradiância de 12 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 3C), pode definir o estágio de desenvolvimento das folhas como moderadamente e severamente senescentes, respectivamente, conforme a relação designada por Lu et al. (2003). Segundo esses autores, folhas senescentes apresentaram consistentemente baixa capacidade fotossintética, se comparado às folhas normais, não senescentes. Outro aspecto importante verificado pelos autores, foi que nas folhas moderada e severamente senescentes, os níveis de irradiância nos quais houve saturação da fotossíntese, a perda de clorofila foi, 50,0 e 75,0% inferior, respectivamente, em relação aquelas ocorrida em folhas normais. O estágio de desenvolvimento de um órgão como a folha, é determinado por seu conteúdo de pigmento. O aumento da idade da folha promove declínio no conteúdo de clorofilas (Behera & Choudhury, 2001). Nina Junior et al. (2005) verificaram em altas irradiâncias, que a degradação de clorofilas tende a ser mais intensa, resultando em menores concentrações de clorofila total. E que, o conteúdo de clorofila em ambiente sombreado foi cerca de seis vezes maior, quando comparado à pleno sol.

5. CONCLUSÕES

- Há uma relação entre o comportamento do crescimento dos ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* com a inativação das enzimas SOD e POD nas maiores irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
- A capacidade rizogênica dos ápices caulinares é influenciada pelo nível de estresse foto-oxidativo;
- Os níveis crescentes de MDA indicam que apenas o aumento na atividade da catalase não é suficiente para remover as espécies reativas do metabolismo do oxigênio, principalmente nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e que a atividade da superóxido dismutase e peroxidase foi diminuída;
- As maiores irradiâncias contribuem para elevar as taxas de etileno e CO_2 . E o aumento nos teores de etileno reduzem os teores dos pigmentos cloroplastídicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.** 2002. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601-639, 1999.

BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f.

flavicarpa Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v.7, n.1, p.47-54, 2001.

BARTOLO, W.C.F.; MACEY, M.J.K. Cobalt requirement in tissue culture of three species: *Brassica oleracea* L., *Passiflora mollissima* Bailey, and *Saintpaulia ionantha* Wendl. **Journal of Horticultural Science**, v.64, n.6, p.643-647, 1989.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiology Plant**, v.19, p.47-64, 1997.

BEHERA, R.K.; CHOUDHURY, N.K. High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts. **Biologia Plantarum**, v.45, n.1, p.45-49, 2002.

BEHERA, R.K.; CHOUDHURY, N.K. High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of chl a fluorescence in primary wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1141-1146, 2003.

BEHERA, R.K.; CHOUDHURY, N.K. Photosynthetic characteristics of chloroplasts of primary wheat leaves grown under different irradiance. **Photosynthetica**, v.39, n.1, p.11-15, 2001.

BELIGNI, M.V.; FATH, A.; BETHKE, P.C.; LAMATTINA, L.; JONES, R. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

CAO, K.-F.; GUO, Y.-H.; CAI, Z.-Q. Photosynthesis and antioxidant enzyme activity in breadfruit, jackfruit and mangosteen in Southern Yunnan, China. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.81, n.1, p.168-172, 2006.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Journal**, v.24, p.667-677, 2000.

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

CRESPO, L.E.C.; CASTRO, H.G.; CAMPOSTRINI, E.; CARNEIRO, L.O.; SCHRAMM, D.U.; STHEL, M.G.; SILVA, M.G.; VARGAS, H. Monitoramento da taxa de emissão de etileno em plântulas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivadas *in vitro* em seis épocas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 9, 2003, Atibaia. **Resumos...** Atibaia, SP, 2003, p.198.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, M. G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, n.7, p.1023-1028, 1993.

del RÍO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1255-1272, 2002.

del RÍO, L.A.; PALMA, J.M.; SANDALIO, CORPAS, F.J.; PASTORI, G.M.; BUENO, P.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. **Biochemical Society Transactions**, v.24, p.434-438, 1996.

del RÍO, L.A.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; BUENO, P.; CORPAS, F.J. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Radical Biology and Medicine**, v.13, p.557-580, 1992.

EMERY, R.J.N.; REID, D.M.; CHINNAPPA, C.C. Phenotypic plasticity of stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*: the role of ethylene and response to wind. **Plant, Cell and Environment**, v.17, p.691-700, 1994.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica do Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GIANNOPOLITIS, C.N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, n.2, p.309-314, 1977.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.2, p.450-455, 1987.

HERNÁNDEZ, J.A.; ESCOBAR, C.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P.M. Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress. **Functional Plant Biology**, v.31, n.4, p.359-368, 2004.

HERNÁNDEZ, J.A.; ESCOBAR, C.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P.M. Antioxidant enzyme induction in pea plants under high irradiance. **Biologia Plantarum**, n.50, n.3, p.395-399, 2006.

JONA, R.; CATTRO, A.; TRAVAGLIO, D. The climateric feature of fruits is reflected in the sensitivity of ethylene of plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.94, p.273-284, 2002.

KADLČEK, P.; TICHÁ, I.; HAISEL, D.; ČAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v.161, p. 695-701, 2001.

KADLEČEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* – grown plantlets. **Plant Physiology**, v.160, p. 1017-1024, 2003.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.5751-5754, 1982.

KUREPIN, L.V.; WALTON, L.J.; REID, D.M.; PHARIS, R.P.; CHINNAPPA, C.C. Growth and ethylene evolution by shade and sun ecotypes of *Stellaria longipes* in response to varied light quality and irradiance. **Plant, Cell and Environment**, v.29, p.647-652, 2006.

KWA, S-H.; WEE, Y-C.; KUMAR, P.P. Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities of photoautotrophic callus of *Platyserium coronarium* (Koenig ex O.F. Mull.) Desv. Under CO₂ enrichment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.75-82, 1997.

LU, Q.; WEN, X.; LU, C.; ZHANG, Q.; KUANG, T. Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.749-754, 2003.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efectos de la luz sobre la germinación de la parchita. **Agronomía Tropical**, v.47, n.4, p.397-408, 1997.

MELO FILHO, A.C.; HOFFMAN, N.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemic Journal**, v.218, p.273-275, 1983.

MORINI, S.; MELAI, M. Net CO₂ exchange rate of *in vitro* plum cultures during growth evolution at different photosynthetic photon flux density. **Scientia Horticulturae**, v.105, p.197-211, 2005.

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

NINA JUNIOR, A. da R.; CHEVREUIL, L.R.; SANTOS JUNIOR, U.M. dos; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F. de C. Eficiência fotoquímica do fotossistema II e índice de conteúdo de clorofilas em plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King) e copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) submetidas a dois ambientes de luz. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.

PIERIK, R.; CUPPENS, M.L.; VOESENEK, L.A.; VISSER, E.J. Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. **Plant Physiology**, v.136, p.2928-2936, 2004.

POSPÍŠILOVÁ, J. SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; ČATSKÝ, J.; WILHELMOVÁ, N.; ŠRÁMEK, F. Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tabacco plantlets to *ex vitro* conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.330, p.119-126, 1999.

POWLES, S. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p.15-44, 1984.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; TOLEDO PRICOLI, E.A.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of

passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. ***In Vitro Cellular, and Developmental Biology-Plant***, v.39, p.618-622, 2003.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v.38, p.995-1014, 2005.

SCHAFFER, L.; FEIERABEND, J. Photoinactivation and protection of glycolate oxidative *in vitro* and in leaves. ***Zeitschrift fur Naturforschung***, v.55, p.361-372, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. ***Fisiologia Vegetal***. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.DEA.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L.DE. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.

TOTOLA, M.R. ***Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperatura supra-ótima***. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. ***Annual Review of Plant Physiology***, v.2, p.231-244, 1951.

Atividade fotossintética e fluorescência da clorofila em plântulas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener cultivadas *in vitro*, sob diferentes irradiâncias

RESUMO

Ápices caulinares do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener foram cultivados *in vitro* em diferentes níveis de irradiância, com o objetivo de avaliar as trocas gasosas e identificar o dano fotoinibitório nas plântulas dessa espécie. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos, com dez repetições. Os tratamentos foram os cinco níveis de irradiância (12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por meio de um analisador de gás no infravermelho modelo Qubt System avaliou-se a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s) e a taxa transpiratória (E). E através do fluorômetro modulado, modelo MINI-PAM, avaliou-se a fluorescência inicial (F_o), a fluorescência máxima (F_m), o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F_m'$), a dissipação fotoquímica (q_p) e não-fotoquímica (q_N e NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). O aumento dos níveis de irradiância promoveu elevação da F_o , redução da relação F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, q_p e ETR, indicando a ocorrência do dano fotoinibitório. Entretanto, com a elevação dos níveis de irradiância, principalmente sob 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se uma crescente dissipação não-fotoquímica (NPQ), que representa a dissipação térmica do excesso de energia que é prejudicial ao processo fotossintético. As plântulas de maracujazeiro-amarelo adaptaram-se melhor às menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sendo assim indicadas no cultivo *in vitro* desta espécie.

1. INTRODUÇÃO

O aspecto clorótico nas estruturas organogênicas (gemas e brotos) formadas em segmentos hipocotiledonares e em tecidos foliares de plântulas que evoluíram de ápices caulinares do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas in vitro (Alexandre, 2002; Couceiro, 2002; Felismino, 2005) é, definitivamente o motivo pelo qual pensou-se em investigar a causa de tal anomalia.

Essa característica na planta pode manifestar-se impulsionada por diversos fatores bióticos e abióticos, conduzindo a inúmeros prejuízos aos explantes, dentre eles até mesmo causar a morte. Alguns desses fatores constituem partes integrantes do ambiente da sala de cultivo do laboratório, como luz, temperatura, umidade relativa do ar e gases diversos; e outros fatores são mais específicos do ambiente interno dos frascos de cultivo, tais como o meio de cultura e gases, como o etileno e o CO₂. Os frascos de cultivo por não permitirem trocas gasosas com o ambiente externo, acumulam no seu interior gases como o etileno e o CO₂ (Chen, 2003).

O cultivo de plantas sob irradiâncias altas pode conduzir a distúrbios fisiológicos de natureza variada, como a senescência foliar e/ou de toda a planta, que nestes casos é iniciada por influências ambientais e regulada por hormônios (Taiz & Zeiger, 2004).

A energia radiante é um fator ambiental que pode limitar o crescimento e a reprodução das plantas. As propriedades fotossintéticas da folha fornecem valiosa informação sobre as adaptações da planta ao seu ambiente luminoso. Quando as folhas das plantas são expostas a irradiâncias maiores do que podem utilizar, o centro de reação do fotossistema II (FS II) é danificado e inativado (Taiz & Zeiger, 2004).

Uma iluminação de alta intensidade sobre os tecidos fotossintetizantes resulta em uma série de reações de estresse, conhecidas como fotoinibição. Segundo Baker et al. (1994), Choudhury & Behera (2001) e Štroch et al. (2004), a fotoinibição é a incapacidade dos tecidos fotossintetizantes em dissipar o excesso de energia radiante. Nas plantas, o dano fotoinibitório pode ser verificado por meio da redução do rendimento quântico, redução da capacidade de fixar CO₂, alterações nas características da fluorescência e do transporte de elétrons entre os fotossistemas.

Uma forma eficiente de monitorar danos fotooxidativos causados pelo estresse tem sido o uso de medidas da fluorescência da clorofila associada ao fotossistema II (PS II) (Baker, 1993; Bolh r-Nordenkampf &  quist, 1993; Newton & McBeath, 1996). Dentre os parâmetros de fluorescência, a rela o F_v/F_m que representa a eficiência quântica potencial do fotossistema II (PS II),   um indicador sensível do desempenho fotossintético de plantas (Bj rkman & Demmig, 1987; Johnson et al., 1993). Alguns trabalhos relatam a utiliza o dessa rela o (Kadle ek et al., 2001; Alexandre, 2002; Kadle ek et al., 2003; Rodriguez Ortiz, 2004; Fuentes et al., 2005), bem como da fotossíntese (Kadle ek et al., 2001; Kadle ek et al., 2003; Fuentes et al., 2005) como forma de avaliar o dano fotooxidativo em explantes cultivados *in vitro*. Os dois primeiros autores avaliaram a taxa fotossintética dos explantes utilizando Eletrodo de Clark, que mede a evolu o do teor de oxigênio, e os últimos autores o fazem diretamente em folhas expandidas e crescidas *in vitro*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as trocas gasosas e identificar o dano fotoinibitório em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fase de obten o das plântulas axênicas

As sementes foram extraídas de frutos maduros e colhidos de uma única planta de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, procedente do pomar do Setor de Fruticultura, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em condi es laboratoriais e mediante uso de uma peneira de malha fina, o arilo das sementes foi removido, pressionando-as cuidadosamente, depois de envolvê-las em cal extinta. Em seguida, as sementes foram lavadas em água de torneira até completa remo o da cal e restos placentários.   continua o, foram submetidas a secagem   sombra, sobre papel toalha, por três dias. Após o processo de secagem, procedeu-se o preparo das sementes. O tegumento externo (episperma) foi completamente removido com auxílio de uma mini-morsa.

As sementes, assim preparadas, foram desinfestadas, sob condições de câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foram submetidas por 1 minuto em solução de etanol a 70% (v/v), seguido de três enxaguaduras; e logo após, imersas em solução de hipoclorito de sódio com 2,4% de cloro ativo do produto comercial Candura[®], durante 20 minutos e, posteriormente, enxaguadas por três vezes em tempos de 1 minuto, sob agitação constante em água desionizada e autoclavada.

O meio de cultivo das sementes foi constituído dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White (1951), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8,0 g L⁻¹ de ágar (Isofar[®]), como agente solidificante. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar. Alíquotas de 10 mL deste meio foram distribuídas por tubo de ensaio (25 x 150 mm). Os tubos, contendo o meio, foram fechados com tampas de propileno transparentes e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

As sementes foram semeadas no meio de cultivo, uma por tubo de ensaio. Após o semeio, os tubos foram fechados como já descrito anteriormente, acondicionados em grades que foram envolvidas com papel alumínio e transferidos para a sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente 60%. O papel alumínio foi utilizado para proteger as sementes contra luz, já que são classificadas, como fotoblásticas negativas por Maciel & Bautista (1997).

O período de incubação foi de 12 dias, tempo suficiente para obter as plântulas axênicas e com tamanho adequado para a obtenção dos ápices caulinares.

2.2. Fase de cultivo dos ápices caulinares

O meio de cultivo para ápices caulinares apresentou a mesma constituição química e o mesmo modo de preparação daquele já descrito para a germinação de sementes. Utilizou-se, inclusive, o mesmo tipo de frasco de cultivo que recebeu a mesma alíquota de 10 mL de meio de cultura. A exceção foi o agente geleificante, que para o cultivo de ápices caulinares foi o Gelrite (Merck[®]) a 2,5 g L⁻¹ de meio.

Os ápices caulinares individualizados foram plantados em condições de câmara de fluxo laminar, na orientação vertical em tubos de ensaio, que foram fechados com duas camadas de filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Os tubos de ensaio, contendo um ápice caulinar cada, foram incubados em sala de crescimento, distribuídos nas prateleiras das estantes, à distância de aproximadamente 5 cm entre si, de forma a não proporcionar sombra nos mesmos, com controle de temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiâncias de 12; 25; 50; 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes OSRAM[®], com potência de 40 W, luz do dia. O modo pelo qual os ambientes espectrais foram conseguidos acha-se descrito no Capítulo III.

O período de incubação foi de 42 dias.

2.3. Características avaliadas

2.3.1. Determinação das trocas gasosas

Para a avaliação das trocas gasosas nas plântulas *in vitro*, inicialmente o ar de referência foi bombeado de uma sacola com concentração de CO₂ conhecida (300 mL m⁻³) para a câmara úmida, confeccionada utilizando um tubo de ensaio, onde no seu interior foi colocado um chumaço de algodão e papel Germiteste[®], ambos umedecidos de forma a promover a elevação da umidade do ar circulante. Após o ar ter circulado por toda a câmara úmida, este foi succionado e injetado no tubo de ensaio onde a plântula de maracujazeiro foi cultivada (Figura 1). Desta forma, o ar que sai apresenta as suas características originais modificadas. A plântula, no momento das análises, é submetida a um feixe de luz infravermelho (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O ar de saída ou ar de análise segue dois caminhos: no primeiro, o ar passa pelo sensor de temperatura e umidade, resultando em leituras que são armazenadas no computador; e, no segundo, por outro lado, o ar de referência segue por um tubo contendo dryrite, onde é retirado toda sua umidade para então passar para o IRGA, onde é medida a concentração de CO₂. A diferença entre a concentração de CO₂ do ar de entrada e do ar de saída do tubo de ensaio contendo a

plântula é utilizada para o cálculo da taxa fotossintética, ou da taxa respiratória se a concentração de CO₂ do ar de saída for maior.

Dessa forma, por meio de um analisador de gás no infravermelho, modelo Qubt System, adaptado à medição das trocas gasosa, avaliou-se a taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E), feitas no próprio tubo de cultivo que continha a plântula.

2.3.2. Determinação da fluorescência da clorofila *a*

Através do fluorômetro portátil modulado, modelo MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B (Bilger et al., 1995; Rascher et al., 2000), avaliou-se a fluorescência inicial (F₀), fluorescência máxima (F_m), rendimento quântico potencial (F_v/F_m = Fluorescência variável/Fluorescência máxima), rendimento quântico efetivo (ΔF/F_m'), a dissipação fotoquímica (q_p), a dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (van Kooten & Snel, 1990) foi calculado após 30 minutos de adaptação ao escuro como $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, onde F₀ é o rendimento de fluorescência mínima, excitado por uma luz vermelha modulada de baixa intensidade (0,03 μmol m⁻² s⁻¹), e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação de um pulso de 0,8s de luz actínica saturante (> 6000 μmol m⁻² s⁻¹). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Genty et al., 1989) foi determinado por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à luz ambiente, sendo calculado como $\Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$, onde F é o rendimento de fluorescência antes do pulso de saturação e F_m' a fluorescência máxima durante o pulso de saturação. O ΔF/F_m' foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al. (1995): $ETR = \Delta F/F_m' \times DFF \times 0,5 \times 0,84$, onde DFF é a densidade de fluxo de fótons (μmol m⁻² s⁻¹) incidente sobre a folha, 0,5 o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996), e 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981). O coeficiente de extinção não-fotoquímica de Stern-Volmer foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger e Björkman, 1990).

2.4. Delineamento experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições (8 tubos de ensaio), onde os tratamentos foram os 5 níveis de irradiância, sendo a parcela experimental constituída de um ápice caulinar cultivado na orientação vertical.

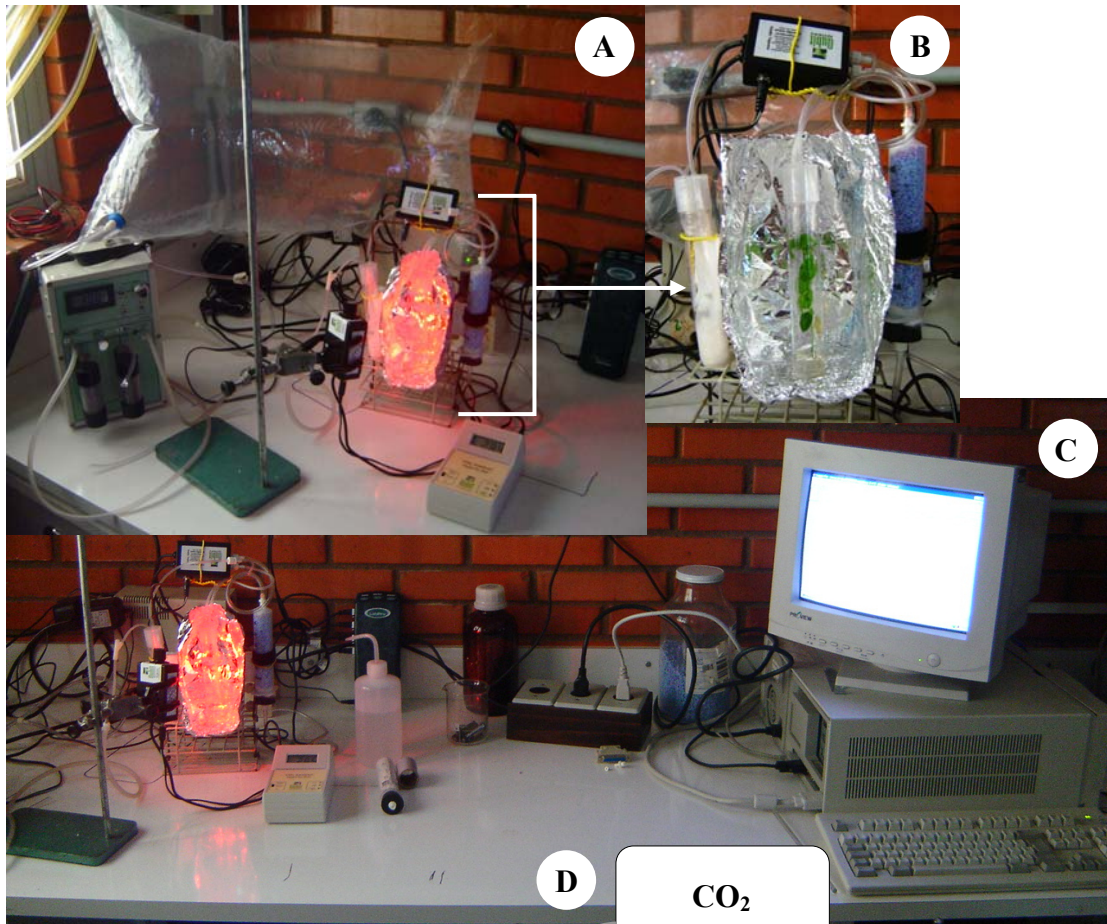


Figura 1. A. Fotografia mostrando os instrumentos utilizados na avaliação das trocas gasosas: sacola de ar; bomba de fluxo; câmara úmida; tubo de análise que contém a plântula de maracujazeiro-amarelo; sensor de temperatura e umidade; drierite; sensor de luz e IRGA. B. Aumento do conjunto composto pelo sensor de temperatura e umidade; câmara úmida; tubo de análise e dryrite. C. Fotografia mostrando o interface e o computador. D. Desenho esquemático: a. sacola com ar de concentração de CO_2 conhecida (300 ml min^{-1}); b. bomba de fluxo; c₁. câmara úmida; c₂. tubo de análise; d. sensor de temperatura e umidade; e. tubo com dryrite; f. sensor de luz; g. IRGA; h. computador; i. interface. (*) papel alumínio para aumentar a reflexão da luz.

3. RESULTADOS

Nas Figuras 2 e 3, tem-se o desempenho fotossintético das plântulas de maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*), avaliado em folhas completamente expandidas, que não as cotiledonares, cultivadas *in vitro* por 35 e 42 dias, respectivamente, sob diferentes níveis de irradiância.

A elevação dos níveis de irradiância reduziu a capacidade fotossintética das plântulas de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro* no período de 35 dias de incubação (Figura 2). As irradiâncias de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ permitiram que as plântulas desta espécie utilizassem a energia proveniente dos tubos fluorescentes, de forma a beneficiar o processo fotossintético. Entretanto, irradiâncias superiores a 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultaram em menor taxa fotossintética, com quedas mais drásticas quando as plântulas foram cultivadas nos ambientes com 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância.

A taxa fotossintética de plântulas cultivadas sob 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi ligeiramente superior ao dobro daquelas cultivadas no ambiente de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância (Figura 2). Isto implica dizer que o aumento dos níveis de irradiâncias nem sempre favorece a atividade fotossintética; ao contrário, as irradiâncias de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no presente trabalho, causaram prejuízos às plântulas dessa espécie. A baixa eficiência fotossintética dessas plântulas nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pode acarretar prejuízos irreversíveis às mesmas, conduzindo-as à morte. Como o objetivo é consolidar o processo de propagação *in vitro*, de forma a obter plantas aptas ao processo de aclimatização, o cultivo dessas em irradiâncias acima de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pode ser prejudicial, tornando-se inviável a sua utilização, em função da não recuperação do estado fisiológico normal da planta.

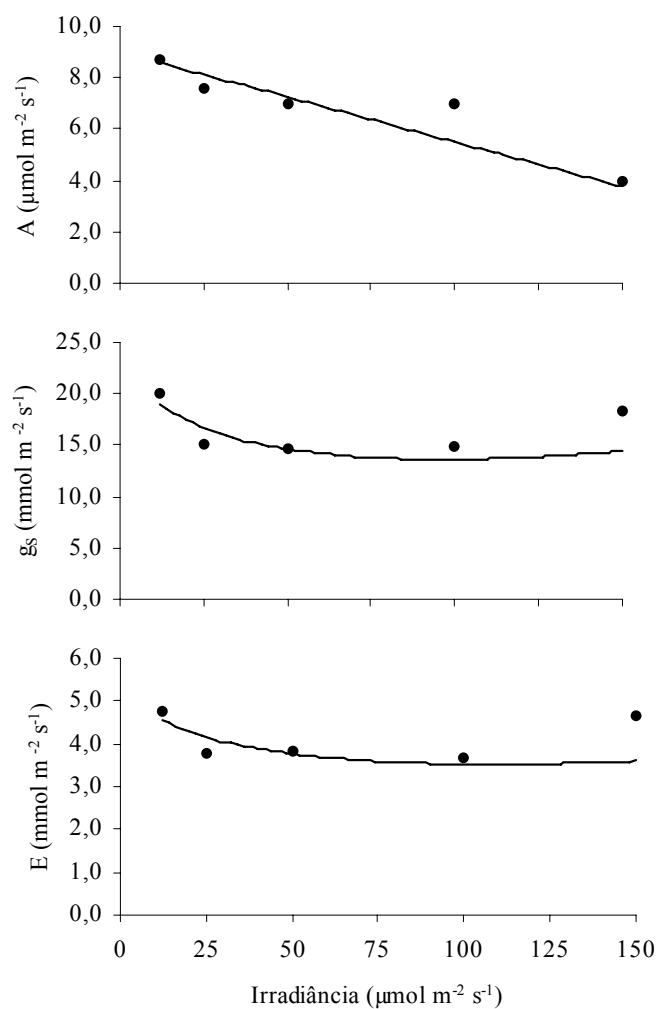


Figura 2. Atividade fotossintética (A , $\hat{Y} = 8,99773 - 0,03498I^*$; $R^2 = 0,94$) condutância estomática (g_s , $\hat{Y} = 26,6213 - 2,65457\sqrt{I^*} + 0,13547I^*$; $R^2 = 0,90$) e transpiração (E , $\hat{Y} = 5,89762 - 0,45774\sqrt{I^*} + 0,0220581I^*$; $R^2 = 0,90$) em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância, por 35 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

A condutância estomática (g_s), que é considerada a medida do fluxo de água e dióxido de carbono através dos estômatos, para dentro e para fora da célula, foi superior nas menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), acompanhando o comportamento da taxa fotossintética até a irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2). Acima desse valor,

observou-se uma quase estabilidade na curva de g_s , isto é, nos ambientes de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O comportamento da g_s foi semelhante ao da transpiração (E), com queda até a irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a partir desse nível, houve constância entre as irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2).

Aos 42 dias de cultivo das plântulas *in vitro*, observou-se aumento na atividade fotossintética para as irradiâncias de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3), se comparado a avaliação feita aos 35 dias (Figura 2). O comportamento da curva da taxa fotossintética indicou na irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o valor de 2,36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com tendência para zero, ou seja, condição esta em que a assimilação fotossintética de CO_2 se iguala à liberação de CO_2 pela respiração. Nos ambientes de maior irradiância (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as plântulas foram incapazes de desempenhar a atividade fotossintética, registrando-se, especificamente nesses dois níveis de irradiância, o processo respiratório (Figura 3). Devido a absorção da radiação ter-se reduzido por motivos de altas irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Figura 3), não foi verificada a fixação de CO_2 pela fotossíntese, porém, sim, sua liberação pela respiração. Portanto, observa-se que a faixa ideal de irradiância em que as plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* podem ser cultivadas sem que torne-se prejudicial a elas, encontra-se entre 12-25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aqueles limitantes a taxa fotossintética, a partir de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3).

Verificou-se com o aumento do tempo de cultivo *in vitro* das plântulas de maracujazeiro nas maiores irradiâncias, a intensificação do nível de estresse, pela comparação entre a taxa fotossintética aos 35 e 42 dias (Figuras 2 e 3, respectivamente). Como o fotoperíodo mantém-se em 16/8 h (luz/escuro), no período de luz a intensidade dos feixes luminosos é constante, diferentemente de ambientes naturais, que pode sofrer variações ao longo do dia, com isso as plântulas não param de receber luz, ficando expostas a níveis de irradiâncias que caracterizam a condição de estresse, assim a fotoinibição é praticamente inevitável.

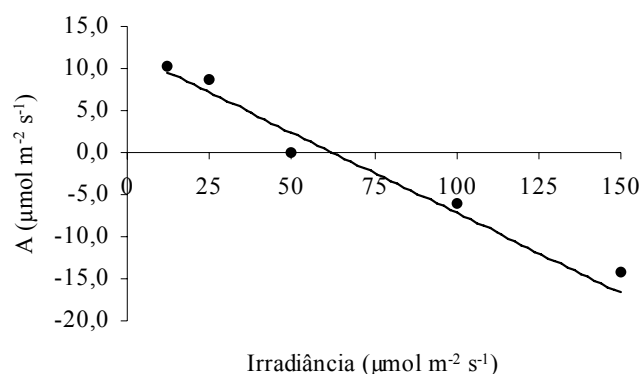


Figura 3. Atividade fotossintética (A, $\hat{y} = 11,8924 - 0,19063I^*$; $R^2 = 0,97$) em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância, por 42 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

Observa-se na Figura 4, maiores valores de fluorescência inicial (F_o) e menores de fluorescência máxima (F_m) com a elevação dos níveis de irradiância. A fluorescência inicial detectada nas folhas de plântulas cultivadas sob irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi de 280,7 e na irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de 378, uma diferença expressiva para uma característica indicadora dos estágios iniciais do dano fotoinibitório (Figura 4). Maiores valores de F_m e menores de F_o (Figura 4) nos níveis de irradiância de 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contribuíram para a elevação da relação F_v/F_m . Entretanto, o contrário traduz em decréscimo na relação F_v/F_m e indicando a tendência para a fotoinibição da fotossíntese.

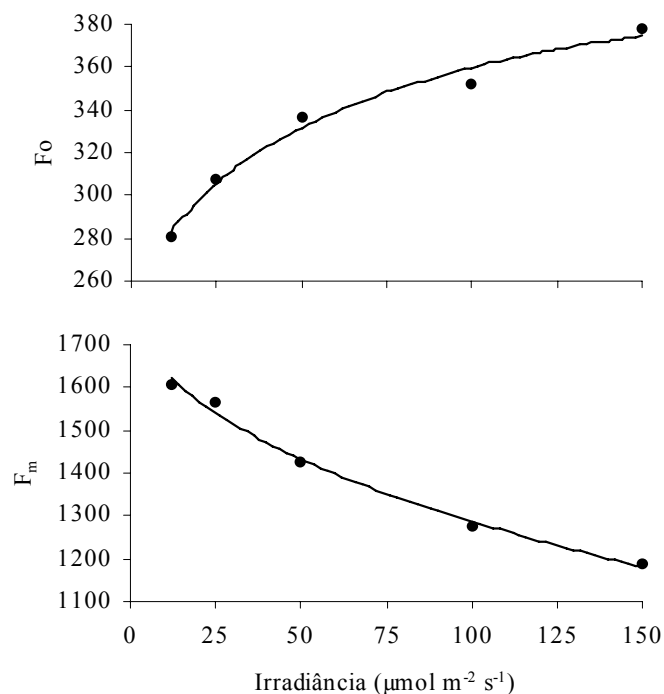


Figura 4. Fluorescência inicial (F_o , $\hat{Y} = 222,845 + 19,4346\sqrt{I^*} + 0,57541I^*$; $R^2 = 0,98$) e fluorescência máxima (F_m , $\hat{Y} = 1815,89 + 57,5937\sqrt{I^*} + 0,47169I^*$; $R^2 = 0,99$), em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância, por 42 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

As variações na F_o e F_m contribuíram para a redução do rendimento quântico potencial do FSII, ou melhor, da relação F_v/F_m (Figura 5). A elevação dos níveis de irradiância reduziu a relação F_v/F_m , com menores valores nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A relação F_v/F_m apresentou comportamento semelhante ao da atividade fotossintética, sendo portanto indicado para mensurar os níveis de estresse nas plântulas.

Na Figura 5, observa-se queda no rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) com o aumento dos níveis de irradiância. As plântulas cultivadas nos ambientes de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram valores de $\Delta F/F_m'$ de 0,756 e 0,718, respectivamente. Verificou-se principalmente nas maiores irradiâncias, clorose intensa nas folhas e no epicótilo como um todo, inclusive apresentado aspecto de enrugamento destes órgãos, sintomas estes de perda da turgescência celular. Neste caso, o estado fisiológico das

plântulas cultivadas sob as maiores irradiâncias, possivelmente contribuiu negativamente para os valores tão baixos de $\Delta F/F_m'$, em torno de 0,588 e 0,325 para as irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 5).

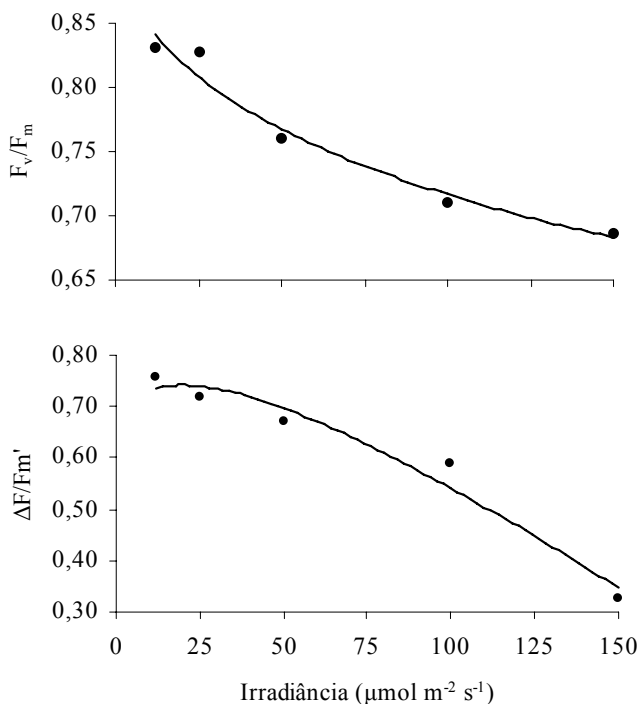


Figura 5. Rendimento quântico potencial (F_v/F_m , $\hat{Y} = 0,92387 + 0,02551\sqrt{I} - 0,00047I$; $R^2 = 0,96$) e rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$, $\hat{Y} = 0,61557 + 0,05713\sqrt{I} - 0,00646I$; $R^2 = 0,96$) do PS II, em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância, por 42 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

Pela Figura 6, observa-se que a elevação dos níveis de irradiância reduziu a dissipação fotoquímica (q_p), ou o “quenching” fotoquímico. Nesse processo, a energia armazenada em clorofilas excitadas pela luz é rapidamente dissipada, principalmente pela transferência de excitação. A curva da taxa de transporte de elétrons (ETR) teve comportamento muito semelhante com a de q_p (Figura 6), confirmando que os níveis

mais elevados de irradiância (100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram prejudiciais à cadeia de transporte de elétrons.

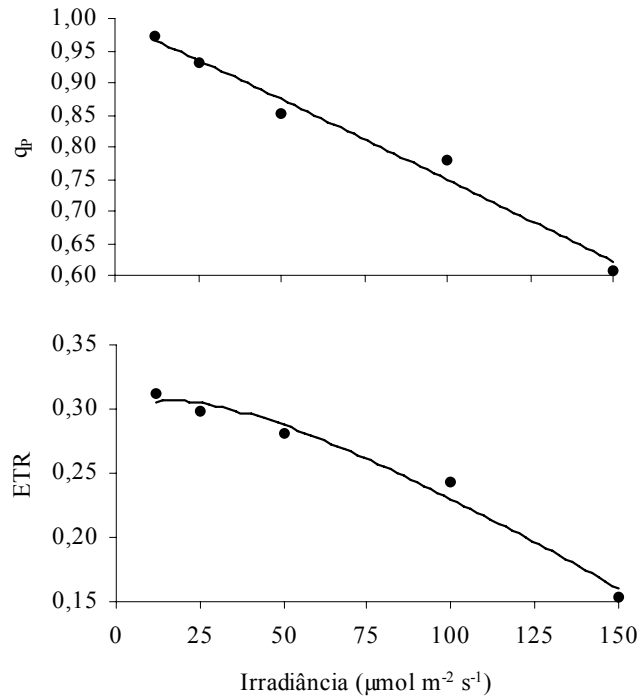


Figura 6. Dissipação fotoquímica (q_P , $\hat{Y} = 0,98643 + 0,00322\sqrt{I} - 0,00269I$; $R^2 = 0,97$) e taxa de transporte de elétrons (ETR, $\hat{Y} = 0,26875 + 0,01835\sqrt{I} - 0,00222I$; $R^2 = 0,97$), em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro*, sob diferentes níveis de irradiância, por 42 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

Observa-se prejuízos ao aparato fotossintético detectado precocemente com a F_o (Figura 4), em seguida na relação F_v/F_m (Figura 5) e finalmente na ETR (Figura 6), naquelas plantas cujo ambiente de cultivo apresentava valores mais elevados de irradiância. Isto implica dizer, que se tratando de efeitos mediados por luz, os valores mais elevados de F_o , baixa relação F_v/F_m e baixa ETR, indicam fotoinibição da fotossíntese.

Na Figura 7, observa-se para as irradiâncias de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ baixos valores de q_N , ao contrário das maiores irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), onde esses valores são muito superiores ao observado na mais baixa irradiância (12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Observa-se, também, que tanto a q_N , quanto NPQ apresentam comportamentos semelhantes, em que, nas maiores irradiâncias (100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) encontrou-se valores mais elevados de NPQ, ao contrário principalmente das menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

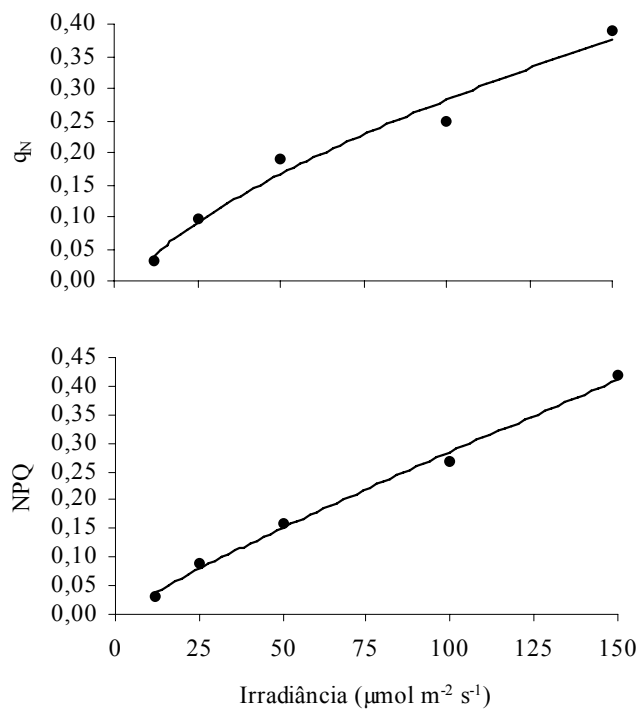


Figura 7. Dissipação não-fotoquímica (q_N , $\hat{Y} = 0,06903 + 0,029\sqrt{I}^* - 0,0006I^*$; $R^2 = 0,97$ e NPQ, $\hat{Y} = 0,02147 + 0,00974\sqrt{I}^* - 0,00208I^*$; $R^2 = 0,99$), em plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, por 42 dias.

*Significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste de F.

4. DISCUSSÃO

A baixa atividade fotossintética e sua limitação nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 2 e 3, respectivamente) são indicativos de que essa espécie, nas condições *in vitro*, não possui mecanismos eficientes em assimilar carbono sob condições de alta irradiância. Entretanto, Fuentes et al. (2005) verificaram aumentos na taxa fotossintética líquida em plantas de coco *in vitro*, com a elevação dos níveis de irradiância. Estes autores observaram que, sob baixa irradiância (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em concentrações de sacarose extremas (0 e 90 g dm^{-3}), as plantas apresentaram concentração de CO_2 de compensação (Γ) um quarto daquelas cultivadas sob alta irradiância (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Segundo Navarro et al. (1994), baixos níveis de irradiância limitam o crescimento normal das plantas cultivadas *in vitro* pela redução na taxa fotossintética líquida, porém sob níveis de irradiância mais elevados a disponibilidade de carbono torna-se o fator limitante para a fotossíntese. Essa idéia não está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, já que vários fatores podem influenciar na taxa fotossintética inclusive a própria planta. Alexandre (2002) verificou no comportamento *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* que a afinidade pela fixação de CO_2 é reduzida, requerendo, a adição de uma fonte de carbono ao meio de cultivo, o que é próprio de plantas C_3 .

Nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observou-se menor condutância estomática (g_s) e transpiração (E) (Figura 2) das folhas das plântulas de maracujazeiro-amarelo, possivelmente como resultado da elevação das taxas de fototranspiração e, ou de algum dano à maquinaria fotossintética (Araus & Hogan, 1994). A fotoinibição é o principal dreno alternativo de elétrons, sendo responsável pelo consumo de ATP e NADPH gerados pelas reações fotoquímicas e colaborando para a manutenção da concentração de CO_2 no interior das folhas (Kozai & Takeba, 1996). Valores baixos de condutância estomática (g_s) indicam maior resistência ao transporte de CO_2 entre o poro estomático e os espaços intercelulares, acarretando com isso, redução na taxa fotossintética. Dessa forma, pode-se supor que a inibição da carboxilação, ao invés do fechamento estomático, foi a principal limitação da fotossíntese (Parkhurst, 1994). Segundo Nina Júnior et al. (2005b), a fotossíntese deixa de ser limitada pela luz em

condições de alta irradiância, passando a ser pela taxa de carboxilação, que reflete a difusão de CO₂ para o interior da folha e a capacidade de carboxilação da rubisco.

As folhas das plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivadas a partir da irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram sintomas típicos de clorose internerval, sendo muito mais pronunciada nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, inclusive nestes dois últimos níveis, observou-se maior facilidade quanto à abscisão das folhas, caracterizando o processo de senescência, iniciado pela perda de clorofila das folhas. Lu et al. (2003) verificaram que a fotossíntese foi saturada aproximadamente à 2000, 1500 e 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em folhas de trigo não senescentes (690 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de clorofila m^{-2} de folha), moderadamente (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de clorofila m^{-2} de folha) e severamente (170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de clorofila m^{-2} de folha) senescentes, respectivamente. Além disso, observaram também que a taxa de assimilação de CO₂ apresentou reduções de 0,047, 0,039 e 0,030 $\mu\text{mol de CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$ de fótons em folhas não senescentes, moderadamente e severamente senescentes, respectivamente.

A fluorescência inicial (F_0) reflete o estado da clorofila a da antena, antes da excitação migrar para o centro de reação (P_{680}) do fotossistema II (FSII) (Oliveira, 2005). Sob condições fotoinibitórias, ocorre rápida diminuição da fluorescência variável (F_v), resultado do rápido declínio da fluorescência máxima (F_m) e da pouca variação da relação (F_v/F_m) (Martinez et al., 2005). A fluorescência inicial (F_0) nem sempre é constante. O seu valor pode aumentar, caso os centros de excitação da antena para os centros de reação estejam prejudicados (Bolhár-Nordenkampf & Öquist, 1993). Mediante essas informações, verifica-se que os valores da F_0 auxiliam, prevendo quantitativamente o estado fisiológico da planta no que se refere ao dano fotoinibitório mediado por luz, no complexo antena. Essa elevação dos valores de F_0 com o aumento dos níveis de irradiância (Figura 4), é um indicativo de que as maiores irradiâncias podem ser consideradas fotoinibitórias e, portanto, inadequadas para o cultivo *in vitro* desta espécie.

A identificação da redução da relação F_v/F_m com o aumento dos níveis de irradiância (Figura 5) demonstra que houve fotoinibição e que plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa*, em condições *in vitro*, apresentam sensibilidade aumentada, quando expostas a altas irradiâncias. Ohira et al. (2005) também verificaram

reduções na relação F_v/F_m em folhas de espinafre com o aumento dos níveis de irradiância, sendo estas mais drásticas com a elevação da temperatura. Segundo os autores, há um grande sinergismo entre o estresse mediado por luz e temperatura, onde a elevação da temperatura e da luz induziu a fragmentação da proteína D1, demonstrando que os locais de rompimento dessa proteína, mediados por calor e luz, são próximos ou possivelmente o mesmo. Quiles & López (2004) verificaram queda no rendimento quântico do FSII com a crescente densidade de fluxo fotônico, em consequência de os elétrons acumularem-se no lado acceptor do FSII. Bjorkman & Demmig (1987) verificaram em situações normais (não estressantes), que a relação F_v/F_m , para a maioria das espécies, tem valor aproximado de $0,832 \pm 0,004$. Estes autores investigaram distintas espécies, dentre elas plantas cultivadas de grande expressão como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), milho (*Zea mays* L.) e inclusive fruteiras, como o mamoeiro *Carica papaya* L. Não obstante, Critchley (1998) verificou que valores abaixo de 0,725 certamente caracterizam a fotoinibição da fotossíntese, ou seja, situação em que a taxa de fotodano excede a de reparo do FSII, isto quer dizer, quando a degradação do polipeptídeo D1 for maior que sua síntese de novo (Melis, 1999). Dessa forma, o processo de danificação e reparo do FSII segue a separação parcial do FSII; exposição do FSII ao fotodano no centro do estroma do cloroplasto; degradação da D1 pelo fotodano; síntese de novo da D1, sua inserção na membrana do tilacóide e reorganização do FSII e finalmente a ativação do processo de transporte de elétrons pela reconstituição do heterodímero D1/D2 (Melis, 1999). Jiao et al. (2004) mostraram que o FSI pode ser fotoinibido sob luz moderadamente alta e que o mesmo não é fotoquimicamente estável como previamente se pensava (Sonoike et al., 1996). Neste estudo, Jiao et al. (2004) detectaram o fotodano pela degradação das proteínas PsaA e PsaB do centro de reação do FSI. No presente trabalho, nas menores irradiâncias (12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as plântulas, por atingirem valores da relação F_v/F_m próximos de 0,836, significa que as mesmas, encontraram-se sob condições normais de cultivo. Entretanto, a partir da irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as plântulas encontraram-se sob condições fotoinibitórias, ainda mais pronunciadas nas maiores irradiâncias (100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 5). Fuentes et al. (2005) encontraram maiores valores para a

relação F_v/F_m (em torno de 0,80) em plantas de coco cultivadas *in vitro* sob irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se comparado àquelas sob irradiância de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Alexandre (2002), ao trabalhar com ápices caulinares de plântulas do maracujazeiro *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados *in vitro*, já havia detectado fotoinibição da fotossíntese a partir de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em todas as concentrações de sacarose estudadas (0, 10, 20 e 30 g L^{-1}). Sendo a fotoinibição mais perceptível, quando os explantes foram cultivados em meio com ausência de sacarose e incubado à irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, Kadleček et al. (2001), ao estudarem a influência de pré-tratamentos no cultivo *in vitro* com tabaco (*Nicotiana tabacum*), pela combinação entre ausência e presença (30 g L^{-1}) de sacarose no meio de cultivo com baixa ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) irradiâncias, o valor máximo encontrado para a relação F_v/F_m foi aproximadamente de 0,8 ao cultivá-las em meio com 30 g L^{-1} de sacarose, independente da irradiância utilizada. No crescimento das plantas de tabaco durante a fase de aclimatização, observaram que aquelas plantas cultivadas em meio com sacarose e incubadas à maior irradiância apresentaram maior valor na relação F_v/F_m , maior conteúdo de clorofila a+b, carotenóides, carboidratos e amido na parte aérea. Kadleček et al. (2003) verificaram em folhas de plantas de tabaco cultivadas *in vitro*, que a eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) foi de 0,70-0,75, independentemente dos níveis de irradiância (80 e $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 30 e 50 g L^{-1}), com exceção de quando as cultivou em meio com ausência de sacarose e sob irradiância de $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde a relação F_v/F_m foi de 0,49.

Behera & Choudhury (2003) verificaram maior redução na relação F_v/F_m , ou seja, cerca de 42,7% em plantas de trigo cultivadas a irradiância de 15 W m^{-2} e depois transferidas para um ambiente de 250 W m^{-2} por 5 dias, se comparado às reduções de 40,4% (30 W m^{-2}) e 8,2% (45 W m^{-2}), indicando que as plantas crescidas nos ambientes com 30 e 45 W m^{-2} são relativamente menos susceptíveis a fotoinibição, principalmente sob 45 W m^{-2} .

As maiores reduções da relação F_v/F_m encontradas nas irradiâncias de 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5) foi em decorrência de maiores incrementos da F_o (Figura 4), indicando danos em maior extensão nos centros de reação do FSII, provavelmente porque a taxa de substituição do polipeptídio D1 fotodegradado ser baixa (Da Matta,

1995). Segundo Kadleček et al. (2001), o processo de aclimatização de plantas de tabaco, cultivadas em meio com ausência de sacarose e expostas à maior irradiância, resultou em reduções no conteúdo de clorofila, relação clorofila a/b e D1/LCH II (polipeptídeo/complexo coletor de luz do FSII). De acordo com Baker (1991), o excesso de radiação provoca a degradação da mais importante proteína do centro de reação do FSII, o polipeptídeo D1. A degradação dessa proteína é consequência aparente da ação tóxica de radicais oxidantes e espécies tóxicas de oxigênio. A destruição do D1, mediado pelo oxigênio singlete, representa bloqueio completo no fluxo de elétrons através do FSII (Baker, 1991). Segundo Genty et al. (1989), o rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) representa melhor as variações no rendimento quântico do fotossistema do que a relação F_v/F_m . O $\Delta F/F_m'$ pode ser utilizado para estimar a taxa de transporte de elétrons em tecidos fotossintetizantes, se o fluxo de fótons fotossintéticos incidente for conhecido. Este parâmetro representa a proporção destes elétrons que são usados na fase fotoquímica (redução do NAD), indica a quantidade de luz absorvida pela P680 utilizada na atividade fotoquímica, além de prever a quantidade de elétrons transportados, sendo um indicador da fotossíntese (Baker & Rosenqvist, 2004). O principal fator determinante desta eficiência é a habilidade com que os elétrons são removidos da quinona receptora do FSII, que está diretamente relacionado com a taxa de consumo dos produtos do transporte fotossintético de elétrons (ATP e NADPH). Diante das informações citadas acima, os ambientes espectrais de 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ podem ser considerados os que melhor condicionaram o funcionamento do aparato fotossintético das plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

O cultivo de plantas sob irradiâncias altas pode conduzir a distúrbios fisiológicos de natureza variada, como a senescência foliar e/ou de toda a planta, que nestes casos, é iniciada por influências ambientais e regulada por hormônios (Taiz & Zeiger, 2004). Folhas moderada e severamente senescentes, apresentaram baixo rendimento da fluorescência do FSII (Φ_{FSII}), se comparado às folhas não senescentes. Esta redução em Φ_{FSII} reflete na diminuição da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII, indicado pela relação F_v'/F_m' (Lu et al., 2003).

Dissipação fotoquímica (q_p) é a utilização da energia luminosa pelos processos fotoquímicos da fotossíntese (doação de elétrons provenientes da molécula de água para

um acceptor denominado NADP (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato)). Representa a energia dissipada que é usada para a formação do poder redutor (NADPH) e da molécula de ATP, os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Este processo é a base da fotossíntese. O decréscimo de q_p , conforme se elevam os níveis de irradiâncias (Figura 6), é um indicativo de dano na cadeia de transporte de elétrons, já que q_p está relacionado com a conservação da energia fotoquímica (Turchetto et al., 2005). Jackowski et al. (2003) observaram que plantas de ervilha cultivadas sob $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram q_p entre 0,92-0,93, valores estes indicativos de centros de reação do FSII com baixo estado de energia, com Q_A mantendo-se oxidado. Quando essas plantas foram aclimatizadas sob irradiâncias de 150, 300 e $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nenhuma mudança significativa foi observada. Entretanto, após 3 dias na condição de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se o início da fotoinibição com q_p reduzido para 0,6.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), a fotossíntese é limitada pela capacidade do ciclo de Calvin em regenerar a molécula acceptora ribulose-1,5-bisfosfato, que depende das taxas de transporte de elétrons. Quiles & López (2004) verificaram que as taxas de transporte de elétrons relativas foram mais baixas em plantas crescidas sob irradiâncias altas (300 W m^{-2}), que naquelas crescidas sob irradiâncias baixas (13 W m^{-2}). Segundo os autores, sob irradiâncias altas, a taxa de transporte de elétrons diminui e, como consequência, tem-se forte dissipação não-radiativa da energia de excitação (q_N e NPQ). Isto reflete na redução da capacidade de transporte de elétrons em plantas crescidas sob irradiâncias altas, como resultado da fotoinibição crônica do FSII, causado pelo excesso de luz. Isto pode ser observado na Figura 7, ou seja, maiores valores de q_N e NPQ foram encontrados nos ambientes de maior irradiância, representando a maneira pela qual as clorofilas dissipam o excesso de energia, de modo a não ser prejudicial aos fotossistemas. Segundo Behera & Choudhury (2003), o NPQ representa a dissipação térmica do excesso de energia que é prejudicial ao processo fotossintético. A dissipação não-fotoquímica (NPQ) expressa a fração da energia dissipada como energia térmica, estando relacionada com fotoproteção (Maxwell & Johnson, 2000). A dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ) é a dissipação da fluorescência da clorofila por outros processos que não o fotoquímico, por exemplo, conversão do excesso de excitação em calor.

Segundo Nina Júnior et al. (2005a), sob condições saturantes de luz, há maior necessidade de dissipar o excesso de energia, de forma a evitar a fotoinibição; por outro lado, sob condições de baixa luminosidade, faz-se necessário maximizar a absorção de luz e a eficiência fotoquímica.

Kadleček et al. (2003), ao cultivarem plantas de tabaco *in vitro* em meio com ausência de sacarose e irradiância de $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificaram também aumento da dissipação não-fotoquímica (NPQ). Behera & Choudhury (2003) observaram que o NPQ aumentou nas folhas de mudas que foram expostas à condição de estresse luminoso, ou seja, crescidas inicialmente sob 15, 30 e 45 W m^{-2} e transferidas por 5 dias para irradiância de 250 W m^{-2} , se comparado àquelas sem estresse.

Dentre os mecanismos relacionados com a fotoinibição está o envolvimento dos carotenóides. Estes desativam diretamente o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e extinguem as clorofilas triplete (^3Chl), reduzindo indiretamente a formação de $^1\text{O}_2$. Também se tem a dissipação térmica do excesso de energia (NPQ) no FSII, processo que requer zeaxantina e que está associado com a deepoxidação da violaxantina para zeaxantina e com o desenvolvimento de um pH trans-tilacoidal (Demmig-Adams & Adams, 1992). Demmig-Adams & Adams (2000) identificaram em um mutante de *Arabidopsis thaliana* que continha um conteúdo normal de zeaxantina, falha no processo de dissipação térmica do excesso de energia. Segundo Li et al. (2000) nesse mutante não foi encontrada a proteína CP22/PsbS, requerida para a mudança conformacional na membrana tilacoidal que participa da dissipação térmica dessa energia.

5. CONCLUSÕES

- A elevação dos níveis de irradiância afeta o rendimento potencial do fotossistema II, pelo decréscimo na relação F_v/F_m ;
- A relação F_v/F_m apresenta comportamento semelhante ao da atividade fotossintética, sendo, portanto, indicada para mensurar os níveis de estresse nas plântulas;

- As plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* adaptam-se melhor às menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sendo assim indicadas para o cultivo *in vitro* desta espécie.
- O sistema de avaliação da atividade fotossintética contribui para analisar plântulas cultivadas *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.** 2002. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ARAUS, J.L.; HOGAN, K.P. Leaf structure and patterns of photoinhibition in two neotropical palms in clearings and forest understory during the drying season. **American Journal of Botany**, v.81, p.726-738, 1994.

BAKER, N. A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.81, p.563-570, 1991.

BAKER, N.R.; FARAGE, P.K.; STIRLING, C.M.; LONG, S.P. Photoinhibition of crop photosynthesis in the field at low temperature. In: BAKER, N.R.; BOWER, J.R. **Photoinhibition of Photosynthesis – from molecular mechanisms to the field.** 1994, p.349-364.

BEHERA, R.K.; CHOUDHURY, N.K. High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of chl_a fluorescence in primary wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1141-1146, 2003.

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and

photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v.25, p.173-185, 1990.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v.102, p.425-432, 1995.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, p.489-504, 1987.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P. (eds). **Photosynthesis and production in a changing environmental**, 1993, pp.193-206, Chapman & Hall, London.

CHEN, C. Development of a heat transfer model for plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, v.85, n.1, p.67-77, 2003.

CHOUDHURY, N.K.; BEHERA, R.K. Photoinhibition of photosynthesis. Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. **Photosynthetica**, v.39, n.4, p.481-488, 2001.

CRITCHLEY, C. Photoinhibition. In: RAGHAVENDRA, A. S. **Photosynthesis: A Comprehensive Treatise**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 264-272.

DA MATTA, F.M. **Desempenho fotossintético do cafeeiro em resposta a tensões abióticas**. 1995, 67p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W.I.I.I. Photoprotection and other responses of plants to high stress. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W.I.I.I. Harvesting sunlight safely. **Nature**, v.403, p.371-374, 2000.

EHLERINGER, J. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. **Oecologia**, v.102, p.366-370, 1981.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. **Biologia Plantarum**, v.49, n.1, p.7-15, 2005.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M.; BARKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimic Biophysic Acta**, v.990, p.87-92, 1989.

JACKOWSKI, G.; OLKIEWICZ, P.; ZELISKO, A. The acclimative response of the main light-harvesting chlorophyll a/b – protein complex of photosystem II (LCHII) to elevated irradiances at the level of trimeric subunits. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.70, p.163-170, 2003.

JIAO, S.; EMMANUEL, H.; GUIKEMA, J.A.; High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in *Brassica napa*. **Plant Science**, v.167, p.733-741, 2004.

KADLEČEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* – grown plantlets. **Plant Physiology**, v.160, p. 1017-1024, 2003.

KADLČEK, P.; TICHÁ, I.; HAISEL, D.; ČAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v.161, p. 695-701, 2001.

KOZAI, A.; TAKEBA, G. Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. **Nature**, v.384, p.557-560, 1996.

LAISK, A.; LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, v.110, p.903-912, 1996

LI, X-P.; BJORKMAN, O.; SHIN, C.; GROSSMAN, A.R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K.K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthesis light harvesting. **Nature**, v.403, p.391-395, 2000.

LU, Q.; WEN, X.; LU, C.; ZHANG, Q.; KUANG, T. Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.749-754, 2003.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efectos de la luz sobre la germinación de la parchita. **Agronomía Tropical**, v.47, n.4, p.397-408, 1997.

MARTINEZ, C.A.; MOREIRA, M.; TORGGGLER, B.; FAVARETTO, V.; HILDEBRAND, H. Photoinhibition of photosynthesis in tropical tree species of differing succession status: a chlorophyll fluorescence study. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.345, p.659-668, 2000.

MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo* ? **Trends in Plant Science**, v.4, n.4, p.130-135, 1999.

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

NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petit Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulturae**, v.60, p.41-54, 1994.

NINA JUNIOR, A. da R.; CHEVREUIL, L.R.; SANTOS JUNIOR, U.M. dos; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F. de C. Eficiência fotoquímica do fotossistema II e índice de conteúdo de clorofilas em plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King) e copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) submetidas a dois ambientes de luz. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005a.

NINA JUNIOR, A. da R.; CHEVREUIL, L.R.; SANTOS JUNIOR, U.M. dos; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F. de C. Trocas gasosas e características fotossintéticas de plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King) submetidas a dois ambientes de luz. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005b.

OHIRA, S.; MORITA, N.; SUH, H-J.; JUNG, J.; YAMAMOTO, Y. Quality control of photosystem II under light stress – turnover of aggregates of the D1 protein *in vivo*. **Photosynthesis Research**, v.84, p.29-33, 2005.

PARKHURST, D.F. Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. **New Phytologist**, v.126, p.449-479, 1994.

QUILES, M.J.; LÓPEZ, N.I. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant growth – Effects on the chloroplasts NADH dehydrogenase complex. **Plant Science**, v.166, p.815-823, 2004.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LUTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p.1397-1405, 2000.

SONOIKE, K. Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. **Plant Cell Physiology**, v.37, p.239-247, 1996.

ŠTROCH, M.; ŠPUNDA, V.; KURASOVÁ, I. Nonradiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. **Photosynthetica**, v.42, n.3, p.323-337, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.DEA.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L.DE. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.

TURCHETTO, A.C.; ZANANDREA, I.; NASSI, F. de L.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Cinética da emissão de fluorescência das clorofilas em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivadas *in vitro* sob estresse salino. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v.25, p.147-150, 1990.

WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, v.2, p.231-244, 1951.

CONCLUSÕES GERAIS

- A germinação de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* é variável de acordo com o genótipo;
- O armazenamento aumenta o poder germinativo das sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*;
- O BAP ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$) influencia negativamente na absorção de nutrientes pelos segmentos de hipocótilo;
- Os maiores níveis de estresse nem sempre correspondem à maior atividade de enzimas antioxidantes; ocorre também queda ou inatividade das mesmas;
- Aumentos crescentes ocorrido na peroxidação de lipídios são indicativos de que a atividade das enzimas antioxidantes não é suficiente para a remoção de espécies reativas de oxigênio;
- No processo organogênico e no desenvolvimento de ápices caulinares *in vitro*, verificou-se que a biossíntese de etileno e CO_2 aumenta com os níveis crescentes de irradiância, e que existe uma relação entre produção de etileno e biossíntese ou degradação de pigmentos cloroplastídicos;
- Na morfogênese *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, a irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ é a que delimita os níveis de irradiância para mais ou para menos, entre as condições que propiciam aumento e declínio da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase;
- A atividade fotossintética e a fluorescência da clorofila contribuem para identificar o nível de estresse fotooxidativo nas plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivadas *in vitro*.