CULTIVO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO
Passiflora

ALESSANDRA CRISTINA BOFFINO DE ALMEIDA MONTEIRO-HARA
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Monteiro-Hara, Alessandra Cristina Boffino de Almeida

Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora* / Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro-Hara. - Piracicaba, 2000.

82 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cultivo "in vitro" 2. Embriogênese somática 3. Maracujá 4. Meio de cultura 5. Melhoramento genético vegetal 6. Organogênese 7. Propagação vegetal I. Título

CDD 634.425

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

CULTIVO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO

Passiflora

ALESSANDRA CRISTINA BOFFINO DE ALMEIDA MONTEIRO-HARA

Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Abril – 2000

Aos meus pais, pela minha formação,

ao meu marido, pelo apoio e carinho,

DEDICO

A Deus,

pela oportunidade de poder estudar,

OFEREÇO

Prova de Trabalho
de
Matemática

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^a. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez, pela orientação, constante disponibilidade e estímulo à pesquisa. Pelo respeito e amizade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Ciências Biológicas, pela possibilidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), onde foram realizados os experimentos.

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, principalmente ao Prof. Dr. Antonio Augusto Lucchesi (*in memoriam*) pela disponibilidade, atenção, amizade e interesse pelo trabalho desenvolvido.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o início do curso. À FAPESP, pela bolsa de estudo (97/10724-1) e auxílio financeiro fornecidos ao projeto de pesquisa.

Ao Prof. Antonio Natal Gonçalves (Ciências Florestais/ESALQ) e ao colega Edson Namita Higashi (IPEF/ESALQ/USP), pela oportunidade de realização do experimento em conjunto, pela atenção e amizade.

À Prof^ª. Dr^a. Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pelas sugestões feitas ao trabalho.

À Prof. Dr^a Clarice G. B. Demétrio (ESALQ/USP), por auxiliar na definição do delineamento estatístico.

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla (CENA/USP), pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas.

Ao João Geraldo Brancalion, do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP), pela colaboração e serviços de computação gráfica.

À bibliotecária chefe Marília Henyei (CENA/USP) pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA (ESALQ/USP), pela utilização dos equipamentos e microscópio eletrônico de varredura.

Ao Prof. Dr. Carlos Ruggiero (FCAVJ, UNESP), à Dra. Laura Molina Meletti (IAC) e ao Dr. Mário Augusto Pinto da Cunha (CNPMPF - EMBRAPA) pela cessão de sementes.

À amiga Liliane C. L. Stipp pelo apoio e auxílio, pelo companheirismo, amizade e respeito, durante todos esses anos de estudo.

À amiga Grasiela F. Perpétuo pelo apoio, amizade e respeito.

Aos amigos e amigas, Juliana A. Fernando, Lúcia H. Albert, Márcio L. Tomaz, Paulo Celso de M. Farias e Silvia B. Filippi pela amizade.

Aos meus pais, por incentivar e estimular meus estudos. Pela dedicação à minha formação, muito obrigada.

Ao meu marido Eduardo, pelo constante incentivo e apoio à realização do meu trabalho, por compreender minhas ausências. Pelo respeito, amor e carinho.

Aos meus avós, Giovanni e Zayra, e a minha tia Sandra que me acolheram em todos esses anos de estudo, pela compreensão e carinho.

Aos meus irmãos José Roberto, José Eduardo e Beatriz, pela amizade que nos une.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Características gerais e importância das espécies <i>Passiflora. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>P. alata</i> e <i>P. suberosa</i>	04
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de espécies de <i>Passiflora</i>	09
2.2.1. <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	10
2.2.2. <i>Passiflora alata</i>	15
2.2.3. <i>Passiflora suberosa</i>	15
2.2.4. Outras espécies de <i>Passiflora</i>	16
2.3. Análise anatômica da morfogênese <i>in vitro</i>	17
2.4. Influência dos nutrientes minerais no cultivo <i>in vitro</i>	20
3. NOVO MÉTODO PARA DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MEIO DE CULTURA PARA MICROPROPAGAÇÃO DE MARACUJÁ AZEDO (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>)	24
3.1. Resumo	24
3.2. Summary	25
3.3. Introdução	26
3.4. Materiais e Métodos	27
3.4.1. Cálculo dos teores dos nutrientes	27
3.4.2. Eficiência do meio de cultura modificado (MSM)	29
3.4.3. Preparo de material para análise ao microscópio eletrônico de varredura	29
3.4.4. Alongamento e aclimação das plantas	30
3.5. Resultados e Discussão	30
3.6. Conclusões	39

4. EFEITO DE BENZILAMINOPURINA e THIDIAZURON EM DISCOS DE FOLHA DE <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e <i>P. alata</i> CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	40
4.1. Resumo	40
4.2. Summary	41
4.3. Introdução	41
4.4. Materiais e Métodos	43
4.4.1. Explante	43
4.4.2. Meio de cultura e condições de cultivo	44
4.4.3. Alongamento de gemas e aclimação das plântulas	46
4.4.4. Preparo de material para análise ao microscópio ótico	46
4.4.5. Preparo de material para análise ao microscópio eletrônico de varredura	47
4.5. Resultados e Discussão	47
4.5.1. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	48
4.5.2. <i>P. alata</i>	55
4.6. Conclusões	59
5. REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE <i>Passiflora suberosa</i> L. A PARTIR DE DISCOS FOLIARES	60
5.1. Resumo	60
5.2. Summary	60
5.3. Introdução	61
5.4. Materiais e Métodos	62
5.5. Resultados e Discussão	63
5.6. Conclusões	66
6. CONCLUSÕES GERAIS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CULTIVO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*

Autora: Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro-Hara

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez

RESUMO

Estudos *in vitro* foram realizados com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata* e *P. suberosa* visando obtenção de plântulas através da organogênese ou embriogênese somática. Inicialmente, estudos foram feitos para adequar o meio de cultura visando melhor crescimento *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*. O novo meio de cultura (MSM), foi desenvolvido com base nos níveis nutricionais considerados adequados para plantas desta espécie, cultivadas em campo. Segmentos nodais de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, em casa de vegetação, foram cultivados em meio de cultura MS ou MSM contendo 3,0 mg/L de BAP, durante 3 subcultivos. Foi feita análise foliar das plântulas e observou-se que aquelas cultivadas em meio MSM apresentaram maiores níveis de Ca, Cu, Fe, Mg e S e baixos teores de B e Cl. Plântulas cultivadas em meio MS apresentaram sintomas de deficiência mineral, enquanto plântulas cultivadas em meio MSM apresentaram folhas sadias. Organogênese a partir de discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata* e *P. suberosa* foi obtida. Benzilaminopurina (BAP), nas doses de 0,5 ou 1,0 mg/L foi eficiente para produção gemas adventícias em *P. suberosa*. A proliferação de calos foi

observada nas bordas dos discos, como fase intermediária da organogênese. BAP (0,6; 0,8 ou 1,0 mg/L) ou thidiazuron (TDZ) (0,25; 0,50; 0,75 ou 1,0 mg/L) induziram a formação de gemas adventícias nas espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. Cortes histológicos mostraram que as gemas foram formadas pela proliferação de células nas bordas dos discos. Essas células diferiram daquelas formadas nos discos de *P. suberosa*, sendo estas, mais friáveis, com proliferação não organizada. TDZ promoveu a formação de um grande número de gemas em relação ao BAP, nos discos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. Entretanto, as gemas induzidas com BAP se desenvolveram mais rapidamente. Plântulas de *P. suberosa* e *P. edulis* f. *flavicarpa* foram alongadas e enraizadas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação. Gemas de *P. alata* não se desenvolveram em meio de alongamento. Estruturas globulares foram formadas juntamente com gemas adventícias nos discos de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, quando cultivados em meio contendo BAP ou TDZ. Cortes histológicos e observações em microscópio eletrônico de varredura mostraram que essas estruturas eram embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento.

IN VITRO CULTURE OF THREE *Passiflora* SPECIES

Author: Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro-Hara

Adviser: Dr. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez

SUMMARY

In vitro studies were done with *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata* and *P. suberosa* to obtain plantlets by organogenesis or somatic embryogenesis. Initially studies were done to adequate the culture medium for better growth of *P. edulis* f. *flavicarpa* plants *in vitro*. A new medium (MSM) was developed based on the leaf nutrients levels considered adequate for this species in the field. Cultures were initiated with nodal segments of *P. edulis* f. *flavicarpa* plantlets grown in the greenhouse, in MS or MSM with 3.0 mg/L BAP, during 3 subcultures. Leaf mineral analysis was done and it was observed that plantlets grown in MSM medium had higher Ca, Cu, Fe, Mg and S levels and lower B and Cl levels. Plantlets grown in MS medium showed visible mineral deficiency symptoms, while plantlets grown in MSM had green healthy leaves. Organogenesis from leaf discs of *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata* and *P. suberosa* was obtained. Benzylaminopurine (BAP) at 0.5 or 1.0 mg/L was efficient to produce adventitious buds in *P. suberosa*. Proliferation of callus was observed on the edge of the leaf discs as an intermediary step. BAP (0,6; 0,8 or 1,0 mg/L) or thidiazuron (TDZ) (0,25; 0,50; 0,75 ou 1,0 mg/L) induced the formation of

adventitious buds in both *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *P. alata*. Histological sections showed that buds are formed from cells proliferating on the edge of the leaf discs. These cells were different from those formed in *P. suberosa* in that those were more friable, more characteristic of unorganized proliferation. TDZ seemed to form larger number of buds, compared to BAP both in *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. alata*, however buds induced in BAP grew faster. Plantlets of *P. suberosa* and *P. edulis* f. *flavicarpa* were rooted *in vitro* and acclimatized in the greenhouse. *P. alata* buds did not develop to form plantlets *in vitro*. Globular structures formed interspersed with buds in *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. alata*, when leaf discs were introduced in medium containing TDZ ou BAP. Histological sections and observations under scanning electron microscopy showed that these structures were early stages of somatic embryos.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro no Brasil possui uma posição de destaque, pois atualmente o país é o maior produtor mundial de suco concentrado. Grande número de espécies são conhecidas e utilizadas para diferentes fins, dividindo-se basicamente em espécies comestíveis, medicinais ou ornamentais. As espécies cultivadas comercialmente são: maracujá azedo ou amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener.), maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims.) e maracujá doce (*Passiflora alata* Ait.). Entretanto, a cultura apresenta problemas em relação à propagação e fitossanidade que comprometem a produção, qualidade dos frutos e rendimento da cultura. A propagação sexuada leva à ocorrência de indivíduos geneticamente diferentes que, em plantios comerciais, é responsável pela redução da qualidade desejável do suco para a indústria, causada pela desuniformidade nas características dos frutos.

A cultura de tecidos em *Passiflora* spp. pode contribuir para obtenção de plantas com características agronômicas desejáveis, utilizando-se as técnicas de micropropagação, hibridação somática ou transformação genética, associadas a programas de melhoramento genético. O processo de micropropagação permite a obtenção de plantas (clones) em larga escala, em tempo reduzido. Através da hibridação somática podem ser obtidas plantas híbridas, combinando-se o genoma de duas espécies de características desejáveis, possibilitando amenizar os problemas de incompatibilidade em cruzamentos interespecíficos. O processo de transformação genética permite a introdução de gene(s) exógeno(s) no genoma de interesse. Através deste processo pode-se isolar gene(s) de resistência a determinada doença e

introduzi-los na espécie de interesse, obtendo-se plantas resistentes. A aplicação de técnicas de transformação genética depende da obtenção de sistemas eficientes de regeneração de plantas.

Após a introdução de genes de interesse em uma determinada espécie é indispensável que plântulas possam ser regeneradas a partir da(s) célula(s) transformada(s). A indução de organogênese ou embriogênese somática na presença ou ausência de uma fase intermediária de calo é utilizada para este fim. Um protocolo de regeneração de plantas *in vitro* é, portanto, imprescindível para trabalhos de transformação genética.

Diferentes espécies respondem diferentemente a estímulos visando a indução da morfogênese, sendo importante a caracterização desses processos. A via de regeneração (organogênese ou embriogênese somática), a região do explante que responde ao estímulo e a presença ou ausência de calo, estão entre as informações de interesse para o planejamento de experimentos visando a manipulação genética de uma determinada espécie. Estudos anatômicos, permitem a caracterização do processo morfogênico *in vitro*.

Estudos visando a otimização do processo de regeneração de plantas são também de grande importância para a obtenção de maior eficiência na regeneração clonal de plantas. Diversos fatores influenciam a qualidade e quantidade de plantas obtidas, podendo-se citar, entre os fatores mais importantes, as condições ambientais, tipos de reguladores vegetais e composição do meio de cultura nas diferentes fases do processo.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver protocolos de regeneração de plantas para espécies de *Passiflora*, através da indução de organogênese e/ou embriogênese somática que possam ser utilizados em trabalhos futuros de transformação genética. A seguir apresenta-se uma revisão bibliográfica (Capítulo 2) sobre o cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora*, com maior ênfase às espécies relacionadas a este trabalho e aos parâmetros de cultivo *in vitro* estudados nesta dissertação. Em seguida apresentam-se três capítulos redigidos em forma de trabalhos científicos.

Inicialmente, realizou-se um trabalho de adequação do meio de cultura para melhor crescimento das plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, pois estas apresentavam severos sintomas de deficiência nutricional *in vitro* (Cap. 3). No capítulo 4, apresentam-se dados referentes à indução de organogênese e embriogênese somática a partir de discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. A regeneração de plântulas a partir de organogênese em discos de folhas de *P. suberosa* é descrita no capítulo 5. No capítulo 6 apresentam-se as conclusões gerais dos três trabalhos desenvolvidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais e importância das espécies *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata* e *P. suberosa*

A família *Passifloraceae* encontra-se largamente distribuída pelos trópicos, apresentando mais de 580 espécies, sendo a maioria destas originárias da América tropical (Sousa & Meletti, 1997). Dentre as espécies comestíveis do gênero *Passiflora*, podemos citar *Passiflora edulis* Sims. (maracujá roxo), *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. (maracujá azedo ou amarelo) e *Passiflora alata* Ait. (maracujá doce) como as mais cultivadas no Brasil.

O Brasil, centro de origem de um grande número de espécies de *Passiflora*, tem atualmente o maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) como seu principal representante. Dentre os países produtores, é o principal produtor mundial com uma área plantada de aproximadamente 33.000 ha (Ruggiero & Oliveira, 1998), distribuída principalmente entre os estados do Pará, Bahia, São Paulo, Sergipe, Ceará, entre outros. O cultivo do maracujá, em contínua expansão, promoveu o crescimento da produção brasileira em cerca de 60% nos últimos oito anos. A região Nordeste é a principal produtora, apresentando, em 1996, uma produção de 176.147 toneladas. Dentre os estados produtores, em 1996, destacam-se a Bahia como maior produtor, com produção de 90.599 toneladas, seguido de São Paulo e Pará, respectivamente com 79.527 e 76.727 toneladas (FNP Consultoria & Comércio, 1999). Atualmente, 65% da produção do maracujá destina-se à comercialização do fruto *in natura*, sendo o restante,

35%, destinado à industrialização, para produção de suco concentrado. Estes valores são praticamente inversos aos observados cerca de dez anos atrás (Rossi, 1998).

O maracujazeiro tem grande importância pelo valor ornamental de suas flores, pelas qualidades gustativas de seus frutos e pelas qualidades farmacodinâmicas e alimentares do suco, cascas e sementes. A importância do maracujá azedo, além da comercialização do fruto *in natura*, está no produto industrializado, sob a forma de suco concentrado, apresentando grande aceitação no mercado internacional. O suco é muito rico em vitaminas A e C, cálcio e fósforo, apresentando, em 100 mL, aproximadamente 20-30 mg de vitamina C, 2.400 mg de vitamina A, 3,8 mg de cálcio e 24,6 mg de fósforo. No suco e nas folhas, encontra-se a *passiflorina*, uma substância que apresenta ação sedativa e calmante, sendo principalmente utilizada para fins medicinais. Como subprodutos da industrialização do suco de maracujá, aparecem as cascas e as sementes, com cerca de 50% e 13% respectivamente, da matéria-prima. A casca, rica em aminoácidos, proteínas e carboidratos, tem sido usada em rações animais, na forma de torta, com coeficiente de digestibilidade melhor do que a casca de citros e abacaxi. As sementes contêm proteínas e óleo comestível, considerado superior ao óleo de algodão em relação ao valor alimentar e digestibilidade (Manica, 1981; Sousa & Meletti, 1997).

A planta do maracujazeiro apresenta-se como trepadeira de grande porte, com crescimento intenso e grande massa vegetativa. Seu caule na base é lenhoso e lignificado, diminuindo o teor de lignina quando se aproxima das extremidades apicais da planta. Na axila de cada folha encontram-se uma gavinha, um botão floral e uma gema vegetativa. As flores são solitárias e protegidas por brácteas foliáceas, apresentando gineceu e androceu. Devido ao seu grande porte, as plantas são cultivadas em sistemas de condução (latada ou espaldeira), visando a sustentação do maracujazeiro (Silva & São José, 1994; Cereda & Ferreira, 1998).

O maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) é amplamente comercializado em todo o país, representando cerca de 90% do mercado, principalmente para consumo em forma de suco. Assemelha-se ao *P. edulis*, diferindo basicamente na pigmentação da casca dos frutos durante a maturação e no tamanho do fruto. A coloração da casca do maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) é amarelo canário e do *P. edulis*, roxa ou púrpura. Os frutos são ovóides ou globosos, e, os roxos, apresentam tamanho do fruto e rendimento industrial inferiores aos do maracujá amarelo. O cultivo comercial do maracujá roxo ocorre principalmente nas regiões mais frias e de altitudes elevadas, sendo apreciado na Austrália e África do Sul, enquanto o maracujá azedo é cultivado em países tropicais e subtropicais (Silva & São José, 1994).

Os frutos de *Passiflora alata* Ait., ou maracujá doce, apresentam-se alaranjados quando maduros, de forma obovóide e sabor doce-acidulado. Os frutos desta espécie são consumidos como fruta fresca, obtendo melhores preços na comercialização. As folhas do maracujá doce também apresentam propriedades sedativas, sendo utilizadas na indústria farmacêutica para o tratamento de excitações nervosas e insônia (Silva & São José, 1994; Sousa & Meletti, 1997).

A propagação do maracujazeiro, pode ser feita através de sementes, ou vegetativamente por meio de enxertia ou estaquia (Grattapaglia et al., 1991; São José et al., 1994). A propagação através de sementes determina, por segregação provocada pela polinização cruzada, indivíduos diferentes, com consequente formação de lavouras heterogêneas, acarretando diferenças nos teores de Brix e coloração do suco, prejudicando o aproveitamento industrial do produto. Apesar disto, em plantios comerciais no Brasil, a propagação é feita principalmente através de sementes. A propagação vegetativa permite a multiplicação de plantas selecionadas pela alta produtividade e teor de suco, como também para o estabelecimento de plantios uniformes. Entretanto, esta prática é mais utilizada em programas de pesquisa e melhoramento do maracujazeiro. A enxertia pode ser realizada visando, principalmente, contornar

problemas fitossanitários através da combinação e multiplicação de espécies mais tolerantes como também para a manutenção de bancos de germoplasma (Grattapaglia et al., 1991; Sousa & Meletti, 1997). Na região de Mogi-Mirim (SP), tem-se observado aumento considerável deste método de propagação (enxertia) para o maracujá doce (Ruggiero & Oliveira, 1998).

O maracujazeiro apresenta elevada auto-incompatibilidade, desta forma, a produção de frutos é somente garantida através da polinização cruzada (Ruggiero, 1991). Em função do elevado grau de auto-incompatibilidade, um plantio clonal de maracujá deverá necessariamente ser composto por clones de compatibilidade cruzada, apresentando um arranjo de plantas que permita a polinização cruzada eficiente, seja por vetores naturais ou através de polinização manual (Grattapaglia et al., 1991).

Apesar da cultura do maracujazeiro possuir uma posição de destaque no Brasil, problemas fitossanitários como a ocorrência de pragas e doenças, levaram a cultura a se tornar transitória de uma região para outra (Ruggiero, 1991). Doenças como a morte prematura, murcha ou fusariose, antracnose e bacteriose (causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) e vírus do endurecimento dos frutos, são economicamente importantes para o maracujazeiro. A cultura também está sujeita a prejuízos causados por pragas como lagartas, percevejos e mosca das frutas, assim como ao parasitismo por nematóides (Baccarin, 1988; Sousa & Meletti, 1997; Goes, 1998; Kitajima, 1998; Malavolta Júnior, 1998; Santos Filho, 1998). Para Oliveira (1987) a murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*) é a principal doença de solo do maracujá, sendo limitante à cultura em determinadas regiões, não havendo forma de controle conhecido, apenas medidas preventivas (Sousa & Meletti, 1997).

Lima (1994) destaca como prioridades de pesquisa o controle integrado da morte prematura de plantas ou murcha, o desenvolvimento de variedades para diferentes agro-ecossistemas, obtenção de material propagativo

selecionado e multiplicado vegetativamente, controle integrado de doenças do caule e sistema radicular, entre outras.

O gênero *Passiflora* apresenta ampla variabilidade, com inúmeras espécies conhecidas. Além das duas espécies de maior importância comercial, *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, diversas outras espécies de *Passiflora* merecem maiores estudos, por apresentarem características ornamentais ou propriedades farmacêuticas. Como espécies comestíveis, podem-se citar *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. maliformis*, *P. setacea*, *P. nitida*, *P. macrocarpa*, *P. caerulea* e *P. cincinnata*. Entre espécies ornamentais, principalmente *P. coccinea*, *P. alata*, *P. suberosa* e *P. misera*, e, como espécies mais utilizadas para fins medicinais, citam-se *P. incarnata*, *P. alata*, *P. edulis*, entre outras (Oliveira et al., 1994).

A espécie silvestre, *P. suberosa*, além de ser considerada ornamental, produz frutos ricos em antocianinas, que podem ser utilizadas como corantes naturais. Apresenta também resistência à fusariose (Gardner, 1989) e ao vírus do endurecimento dos frutos (Otoni et al., 1996), características de grande interesse para programas de melhoramento do maracujá azedo.

Algumas espécies, apresentam certa tolerância ou resistência a determinadas doenças. Sabe-se que *P. alata* apresenta resistência à morte prematura de plantas (Oliveira et al., 1994; Ruggiero et al., 1996; Sousa & Meletti, 1997), podendo ser utilizado como porta-enxerto para maracujá azedo. Parece também não ser afetada pela murcha ou fusariose causada por *Fusarium oxysporum* ou *F. solani*. As espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* são resistentes à antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Oliveira et al., 1994). A primeira é resistente à podridão de *Phytophthora*, enquanto a segunda é altamente suscetível aos nematóides formadores de galhas (Ruggiero & Oliveira, 1998).

Essas observações são de suma importância para programas de melhoramento da cultura do maracujazeiro. Através de técnicas biotecnológicas, como hibridação somática ou transformação genética, podem-

se combinar características desejáveis, visando a obtenção de plantas mais resistentes ou tolerantes às doenças em espécies sexualmente incompatíveis. Enquanto a hibridação somática, via fusão de protoplastos, permite a combinação do genoma de duas espécies, a transformação genética permite a transferência de gene(s) de resistência para a espécie de interesse. Por este processo, é possível transferir genes de resistência a condições adversas isolados de espécies silvestres, para espécies cultivadas.

2.2. Cultivo *in vitro* de espécies de *Passiflora*

Em espécies frutíferas, desde o início de sua utilização, técnicas de cultura de tecidos vêm proporcionando maior disponibilidade de plantas de boa qualidade fitossanitária, sendo utilizadas já em escala comercial para várias espécies de fruteiras, como: morangueiro, bananeira, citros, macieira, mangueira, mamoeiro, entre outras (Caldas & Grattapaglia, 1986). Além da cultura de meristemas e micropropagação clássica, técnicas como a embriogênese somática permitem uma propagação rápida do material superior e sadio. A cultura de tecidos pode contribuir para o melhoramento de fruteiras através de técnicas como cultura de embriões ou de anteras, fusão de protoplastos, assim como pela possibilidade de aproveitamento de variação somaclonal observadas em culturas *in vitro*.

Vaz (1991) cita o maracujá, entre as fruteiras que podem se beneficiar grandemente das técnicas biotecnológicas. Algumas das contribuições imediatas citadas pelo autor são a propagação clonal a partir de matrizes superiores, a micropropagação de porta-enxertos, limpeza fitossanitária de clones, entre outras.

A grande maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Passiflora* foram realizados com *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* estando relacionados à indução e multiplicação de gemas através de segmentos nodais, internodais e discos foliares. Indução de embriogênese somática foi somente relatada por Otoni

(1995), a partir de segmentos de folha de *P. giberti*. Trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos são relatados para algumas espécies por Dornelas & Vieira (1993), D'Utra Vaz et al. (1993), Otoni (1995) e Otoni et al. (1995a,b; 1996).

Regeneração de plantas através de organogênese e a micropropagação de espécies de *Passiflora* vêm sendo obtidas por vários autores, através de diversos tipos de explantes. A maioria dos reguladores vegetais utilizados são do grupo das citocininas, principalmente BAP (6-benzilaminopurina), KIN (cinetina) e zeatina, podendo ser acrescidas pequenas concentrações de auxinas como NAA (ácido naftalenoacético), IAA (ácido indolilacético) ou 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético).

A organogênese *in vitro* pode ser definida como o processo pelo qual células e tecidos vegetais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo ou radicular, cujo sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido de origem (Thorpe, 1994). É o processo pelo qual tecidos vegetais produzem órgãos adventícios *in vitro*, podendo ocorrer direta (sem formação de calo) ou indiretamente, através da formação de calo (Burritt & Leung, 1996).

2.2.1. *Passiflora edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*

Moran Robles (1978 e 1979) cultivou gemas axilares e entrenós de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. mollissima* respectivamente, e obteve sucesso no desenvolvimento de calos e multiplicação vegetativa. Os explantes foram cultivados em meio de Nitsch (1968) em presença de 2,0 mg/L de cinetina. Para a primeira espécie, o cultivo foi seguido de transferência para meio com IAA. As plantas regeneradas apresentaram número de cromossomos $2n=18$, mantendo as características genéticas das plantas de origem.

Crescimento *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* utilizando segmentos nodais de plantas adultas e hipocótilo de plântulas foi estudado por Baccarin (1988). O

desenvolvimento da parte aérea foi observado em ambos os tipos de explantes cultivados em meio de Nitsch & Nitsch (1969) acrescido de 2,0 mg/L de cinetina. A proliferação de calos foi abundante nos segmentos nodais cultivados em meio contendo 2,0 mg/L de cinetina e 0,1 mg/L de NAA.

Drew (1991) promoveu o desenvolvimento de gemas axilares de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* em meio de cultura contendo 2iP (6-isopenteniladenina) e IAA. A multiplicação das plantas foi realizada em meio contendo citocininas (BAP, cinetina) e auxina (IAA).

A micropropagação de *Passiflora edulis* (maracujá roxo) foi obtida com sucesso por Kantharajah & Dodd (1990). Segmentos nodais foram cultivados em meio MS contendo 2,0 mg/L de BAP e 2% de sacarose durante 4 semanas, seguido de cultivo em meio similar, sem regulador vegetal, por 1 a 2 semanas. O enraizamento das plântulas foi feito em meio acrescido de 1,0 mg/L de NAA, durante 5 semanas. Em estudos posteriores, trabalhando com a mesma espécie, os autores obtiveram somente calo e raízes quando introduziram discos de folha em meio MS com diferentes concentrações de NAA e BAP.

A regeneração de *P. edulis* foi obtida por Amugune et al. (1993), quando discos de folha foram cultivados em meio MS contendo 8,9 μ M de BAP (2,0 mg/L) ou em meio contendo 8,9 μ M de BAP e 2,32 μ M de cinetina (0,5 mg/L), durante 4 semanas. O enraizamento foi feito no mesmo meio, acrescido de 0,54; 2,69 ou 5,37 μ M de NAA (0,1; 0,5 ou 1,0 mg/L, respectivamente).

Kawata et al. (1995), obtiveram os melhores resultados para multiplicação de gemas regeneradas de segmentos de folha de *P. edulis* utilizando meio MS contendo 0,23 mg/L de BAP e 0,20 mg/L de AIB (ácido indolbutírico), 30% de sacarose, cultivados em presença de luz. Posteriormente, as gemas obtidas foram transferidas para meio acrescido de 0,023 ou 0,23 mg/L de BAP para desenvolvimento.

Diferentes fontes de explantes, reguladores vegetais e concentrações de água de coco foram avaliados por Dornelas & Vieira (1994), utilizando espécies de *Passiflora*, incluindo *P. edulis* f. *flavicarpa*. Organogênese a partir de

cotilédone, hipocótilo e discos de folha foi obtida nos explantes cultivados em meio contendo 1,0 mg/L de BAP, sob condições de 16 horas de luz. A adição de 10% de água de coco favoreceu a formação de gemas adventícias. Este efeito também foi observado por Kantharajah & Dodd (1990) durante a micropropagação de *P. edulis*, onde os explantes cultivados em meio com 200 mg/L de água de coco apresentaram maior número de brotos.

Trabalhando com *P. edulis* f. *flavicarpa*, Monteiro et al. (1996) estudaram a organogênese a partir de discos de folhas, avaliando-se doses de BAP e regiões foliares. Verificou-se que, nas condições testadas, discos da região proximal da folha cultivados em meio contendo 0,5 mg/L de BAP e, explantes da parte distal em meio com 1,0 mg/L de BAP apresentaram os melhores resultados. Discos coletados da nervura central apresentaram abundante formação de calos esbranquiçados e compactos, não organogênicos. Também observou-se que os explantes responsivos aos tratamentos foram aqueles que apresentaram a face adaxial em contato com o meio de cultura.

Faria & Segura (1997a) estudaram a influência do tiosulfato de prata e de sais do meio de cultura durante a indução de organogênese em explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Hipocótilo e discos de folha foram cultivados em meio contendo BAP e NAA, avaliando-se diferentes concentrações e fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), adição de agente solidificante (Difco-Bacto ágar), meios de cultura MS e WPM (Lloyd and McCown, 1980) e efeito do tiosulfato de prata (STS) como inibidor da síntese de etileno, desfavorável à morfogênese. Os autores observaram a superioridade do meio MS solidificado, contendo ambas as fontes de nitrogênio. A adição do STS (8,8 μM) favoreceu a formação de maior número de gemas adventícias nos discos foliares, pela redução no acúmulo de etileno. As plântulas obtidas foram enraizadas em meio MS sem adição de regulador de crescimento, sendo posteriormente aclimatadas e levadas ao campo.

Propagação *in vitro* foi obtida utilizando como explantes meristemas apicais de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os explantes foram cultivados em

meio MS contendo doses de BAP, sob 16 h de fotoperíodo. O crescimento das gemas foi observado em todos os tratamentos testados, sendo que a presença do BAP (2 ou 5 μM) promoveu a multiplicação das gemas axilares. O efeito das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ também foi avaliado. A proliferação das gemas foi reduzida somente em proporções muito baixas entre esses sais (16:1 ou 1:16). O enraizamento das plântulas foi feito em meio sem adição de auxina e a aclimação foi facilmente obtida, com taxa de sobrevivência entre 95 e 100% (Faria & Segura, 1997b).

Kuriyama et al. (1998) estudaram o efeito do herbicida clorsulfuron na morfogênese de explantes foliares de *P. edulis*. Organogênese a partir de segmentos foliares foi promovida em meio MS acrescido de 10 μM de BAP (2,5 mg/L). Após três semanas, observaram que o clorsulfuron inibiu a morfogênese nos segmentos foliares e retardou a proliferação de calos. Este herbicida parece estar envolvido na inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de aminoácidos. Seu efeito foi proporcional ao tempo de exposição, levando à necrose do material. Os tecidos não tratados apresentaram maior formação de gemas adventícias.

A regeneração de plantas provenientes de protoplastos de mesófilo foliar de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi obtida por D'Utra Vaz et al. (1993). Os protoplastos isolados formaram calos em meio MS contendo 5,0 mg/L de NAA e 0,25 mg/L de BAP. Os autores observaram que o antibiótico cefotaxima estimulou as divisões celulares iniciais dos protoplastos promovendo a formação de microcalos. As gemas regeneradas dos calos foram transferidas para meio com 1,0 mg/L de BAP. O enraizamento foi promovido em meio MS com 3,0 mg/L de AIB e 0,5 mg/L de NAA.

Protoplastos foram isolados de cotilédones de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* e duas espécies selvagens, *P. amethystina* e *P. cincinnata*. A regeneração de gemas foi obtida quando os calos foram cultivados em meio MS com 2,0 mg/L de BAP e 10% de água de coco. *P. cincinnata* mostrou alta frequência de formação de gemas adventícias. O enraizamento foi promovido

em meio MS com metade da concentração dos sais e livre de reguladores (Dornelas & Vieira, 1993). Em estudos posteriores, Dornelas et al. (1995), promoveram a regeneração de plantas a partir de cultura e fusão de protoplastos de tecido foliar de *Passiflora* spp., incluindo *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os calos formados, derivados dos protoplastos, foram transferidos para meio MS acrescido de 2,0 mg/L de BAP e 10% de água de coco, cultivados sob condições de luz para indução de brotos. As plantas regeneradas foram individualizadas e transferidas para meio MS básico com metade da concentração de sais e vitaminas para promover o enraizamento.

Hibridação somática a partir de eletrofusão de protoplastos isolados de mesófilo de *P. incarnata* x *P. edulis* f. *flavicarpa* foi obtida por Otoni (1995). Os calos obtidos foram transferidos para meio de indução de organogênese, com alternância dos meios de cultura. Os híbridos obtidos apresentaram características morfológicas intermediárias.

Manders et al. (1994), trabalhando com transformação de *P. edulis* f. *flavicarpa* através da *Agrobacterium tumefaciens*, promoveram a regeneração de plantas provenientes de discos de folha quando cultivados em meio MS contendo BAP (1,0 mg/L) e 86 µM de kanamicina (50 mg/L). O enraizamento foi promovido em meio com IAA (2,6 mg/L) e NAA (0,5 mg/L), durante 7 dias.

Transformação genética em *Passiflora* via *Agrobacterium tumefaciens* foi obtida por Otoni, (1995). Observou-se a sobrevivência dos explantes foliares aos antibióticos kanamicina e geneticina. Esta, inibiu, proporcional à concentração, a organogênese e a degradação da clorofila nos explantes transformados. A diferenciação de brotos em raízes transformadas de *P. edulis* f. *flavicarpa* ocorreu em meio MS contendo 100 mg/L de kanamicina e 250 mg/L de cefotaxime.

2.2.2. *Passiflora alata*

O cultivo *in vitro* de gemas axilares de plantas juvenis e adultas de espécies de *Passiflora*, incluindo *P. alata*, foi estudado por Drew (1991). Os explantes de plantas adultas iniciaram o crescimento em meios MS ou De Fossard et al. (1974), contendo 2iP (30,6 mg/L) e IAA (3,0 mg/L). A redução da concentração dos reguladores promoveu um aumento acentuado no crescimento das gemas axilares, mantendo a dominância apical. Nos explantes juvenis, o crescimento foi obtido com cinetina (2,0 mg/L) e IAA (0,9 mg/L). A multiplicação foi obtida em meio MS com 4,5 mg/L BAP, 2,0 mg/L cinetina e 0,9 mg/L IAA. O autor relata a importância do cultivo no escuro durante uma semana, permitindo ação do IAA no estímulo ao crescimento das gemas, pois este regulador sofre oxidação na presença de luz.

Regeneração de plantas de *P. alata* foi também obtida por Dornelas et al. (1995) a partir de cultura e fusão de protoplastos isolados de células em suspensão. Os calos, cultivados na luz, promoveram a formação de gemas em meio MS contendo 2,0 mg/L de BAP. Híbridos somáticos foram obtidos de *P. alata* x *P. edulis* f. *flavicarpa*.

2.2.3. *Passiflora suberosa*

O florescimento *in vitro* de *Passiflora suberosa* foi estudado por Scorza & Janick (1980), utilizando explantes de folhas, ramos, gavinhas, flores e raízes. O florescimento foi obtido utilizando-se segmentos internodais cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 0,1 mg/L de BAP, 3% de sacarose, sob condições de luz. Os autores observaram que a formação de gemas florais foi dependente da presença de BAP, com exceção dos tecidos juvenis, que, mesmo cultivados com o regulador, não apresentaram florescimento.

Estudos realizados com isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa*, comprovaram a superioridade de tecidos juvenis como fonte de protoplastos em relação aos tecidos adultos. Explantes de tecidos juvenis apresentam efeito marcante sobre o rendimento e a viabilidade dos protoplastos obtidos (Otoni et al., 1996).

2.2.4. Outras espécies de *Passiflora*

Vestri et al. (1990) cultivaram discos foliares de 10 mm e segmentos internodais de *P. caerulea* em meio MS com diferentes concentrações e combinações de reguladores vegetais como 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), BAP, NAA e GA₃ (ácido giberélico). A regeneração de plantas mais eficiente foi obtida com 2,0 mg/L de BAP em combinação com 2,4-D entre 0,5 e 1,5 mg/L. A partir de segmentos internodais apenas calo foi obtido, enquanto que, nos explantes foliares, calo e gemas foram formados.

Regeneração de plantas a partir de endosperma de *P. foetida* foi obtida meio MS semi-sólido acrescido de 2 µM de BAP (0,45 mg/L) e 0,09 M de sacarose (30 g/L), cultivados sob fotoperíodo de 16 h. O crescimento e desenvolvimento das gemas foi feito em meio com 29 µM de GA₃ (9,5 mg/L) e 1000 mg/L de caseína hidrolizada. Para o enraizamento, foi adicionado 5 µM de NAA (1,0 mg/L) ao meio MS (Mohamed et al., 1996).

Otoni et al. (1995a), observaram a regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de mesófilo de *P. coccinea*. Na fase de subcultivo dos calos derivados de protoplastos, a alternância do meio MS acrescido de 1,0 mg/L de zeatina e meio MS contendo 1,0 mg/L de BAP e 0,001 mg/L de NAA, aumentou a frequência de calos nodulares potencialmente organogênicos.

Otoni et al. (1995b) avaliaram a influência do antibiótico cefotaxima no cultivo de protoplastos isolados de mesófilo de *P. incarnata*. A presença do antibiótico nas concentrações de 100 ou 250 mg/L promoveu aumento das

divisões celulares e da eficiência de plaqueamento dos protoplastos. As divisões celulares foram reduzidas na ausência do antibiótico.

Estudos do comportamento *in vitro* de *Passiflora nitida*, como estabilidade mitótica, indução de organogênese e isolamento de protoplastos de mesófilo, foram realizados por Passos (1999). Ápices caulinares e segmentos nodais foram cultivados em meio contendo doses de BAP. Em ambos os tipos de explante, houve efeito benéfico do BAP na indução de brotamento das gemas e desenvolvimento de folhas novas. Pela análise citológica realizada, pode-se concluir que o cultivo *in vitro* não induziu alterações no número de cromossomos das plantas avaliadas. Organogênese a partir de discos foliares de plântulas germinadas *in vitro* foi obtida em meio de cultura contendo 0,5 ou 1,0 mg/L de BAP, sem adição de NAA e água de coco, não foram favoráveis para indução das gemas adventícias para esta espécie.

Aparentemente, o único relato de indução de embriogênese somática em *Passiflora* foi feito por Otoni (1995). A indução de calos embriogênicos a partir de folhas de plântulas de *P. giberti* foi obtida em meio de cultura MS acrescido de diferentes concentrações de picloram (2,4; 4,8 ou 7,2 mg/L), em ausência de luz. Os calos com características embriogênicas foram transferidos para meio MS líquido contendo 2,4 ou 4,8 mg/L de picloram, cultivados no escuro, sob agitação, por 45 dias. O desenvolvimento dos embriões somáticos foi promovido em meios de cultura B5 e AA2. Pela análise histológica, observaram-se nódulos meristemáticos ou próembriões, formados na periferia dos calos.

2.3. Análise anatômica da morfogênese *in vitro*

Os processos de regeneração de plantas *in vitro* podem ser avaliados e caracterizados pela análise histológica e morfológica do material vegetal. Estudos histológicos podem ser realizados para verificação e confirmação da via de regeneração, diferenciando-se organogênese de embriogênese somática. Caracterizando-se a via de regeneração, podem-se estabelecer

melhores condições de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes para indução e obtenção de plantas. Cortes histológicos seriados, além de permitir a observação da formação de gemas adventícias ou de embriões somáticos, definindo-se se são formados direta ou indiretamente, permitem caracterizar as alterações celulares e a atividade de organelas durante os processos, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente morfogênicos.

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

Caracterização histológica da regeneração de *Saccharum* spp. a partir de calos foi estudada por Falco et al. (1996). Houve formação de dois tipos de calos, um nodular, compacto e com células de citoplasma denso, e outro mais friável, translúcido com células grandes e alongadas. A regeneração de plantas ocorreu apenas a partir dos calos nodulares. Os cortes histológicos realizados em amostras destes calos mostraram formação de centros meristemáticos (meristemóides) na periferia do calo. Foi observada formação de gemas adventícias, apresentando estrutura monopolar, com meristema apical e primórdios foliares, e também estruturas bipolares, com meristema apical e radicular, sem conexão vascular com as células do calo, caracterizando embriões somáticos. Confirmou-se que a regeneração de plantas, nas variedades estudadas, ocorreu através de organogênese e embriogênese somática.

Biasi et al. (comunicação pessoal), observaram a formação de gemas adventícias em segmentos internodais de maracujá azedo (*P. edulis* f.

flavicarpa). A organogênese foi acompanhada através de microscopia ótica e eletrônica de varredura. Pela análise dos cortes histológicos, observou-se a proliferação de células nas extremidades excisadas dos explantes. A diferenciação das gemas ocorreu nessa região, a partir do procâmbio. Em trabalhos de transformação genética, isso parece ser favorável ao co-cultivo com *Agrobacterium*, viabilizando o processo. As observações em microscópio eletrônico permitiram visualizar primórdios foliares, em diferentes estádios, associados à formação de calo.

Estudos anatômicos em discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram realizados por Appezzato-da-Glória et al. (1999). Os efeitos dos reguladores BAP e NAA e a presença ou ausência de luz na indução de organogênese foram avaliados. Pela análise histológica dos discos cultivados em BAP, na presença de luz, observou-se formação de centros meristemáticos após o 14º dia, e próximo do 28º dia, gemas adventícias resultantes da atividade mitótica de células parenquimáticas foram observadas. Esta formação também ocorreu nos explantes cultivados no escuro, porém, em menor intensidade. Os explantes cultivados com NAA apresentaram desenvolvimento de meristema radicular quando cultivados no escuro.

Estudos histológicos realizados em *Nicotiana tabacum* mostraram que durante a formação de gemas adventícias a partir de “camadas finas de células” de hipocótilo, ocorrem divisões celulares nas células epidérmicas, originando centros meristemáticos (Creemers-Molenaar et al., 1994). Arai et al. (1997) realizaram experimentos para caracterizar as células e áreas de formação das gemas e as alterações ultraestruturais ocorridas durante a organogênese em segmentos de hipocótilo desta espécie. A formação das gemas foi observada nas células corticais, especialmente naquelas abaixo dos estômatos. Observações ultraestruturais mostraram alterações nos plastídeos durante a organogênese, ocorrendo maior acúmulo de amido no início de cultivo, diminuindo após a formação dos centros meristemáticos. Os autores sugerem que os plastídeos apresentam função importante durante a citodiferenciação.

Vários trabalhos têm sido realizados com objetivo de estudar o processo morfogênico em diferentes explantes, observando o local de regeneração, presença de células meristemáticas e a formação de estruturas, gemas adventícias ou embriões somáticos. Estudos visando a observação das células ou tecidos morfogênicos vêm sendo realizados para aplicação em sistemas de transformação genética. Análise de tecidos morfogênicos co-cultivados com *Agrobacterium* ou bombardeados, relacionados com a presença da atividade do GUS nos explantes foi realizada por Taylor & Vasil (1991), Mukhopadhyay et al. (1992), Creemers-Molenaar et al. (1994), Geier & Sangwan (1996).

O sucesso do processo de transformação genética é dependente de um protocolo eficiente de regeneração de plantas e da área de regeneração nos explantes. É importante que o local atingido pela transformação, através da *Agrobacterium* ou bombardeamento, seja coincidente com a área morfogênica do explante. Alves (1999), trabalhando com transformação genética de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) via *Agrobacterium tumefaciens*, observou, através de cortes histológicos, que o gene repórter *uidA* foi coincidente com áreas meristemáticas ou organogênicas. A reação positiva do GUS pode ser observada nas células epidérmicas e subepidérmicas de nós cotiledonares, nos mesmos tipos celulares que originam os meristemóides e desenvolvem gemas adventícias, viabilizando a obtenção de plantas transgênicas de soja mediada por *Agrobacterium*.

2.4. Influência dos nutrientes minerais no cultivo *in vitro*

O suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura é essencial para sistemas de cultivo *in vitro*, variando conforme a espécie vegetal e o processo de cultivo. A indução de organogênese ou embriogênese somática em explantes vegetais, assim como a multiplicação e crescimento de plântulas, são altamente dependentes da composição dos nutrientes minerais no meio de cultura.

Kantharjah & Dodd (1990), observaram clorose nas plântulas de *P. edulis*, cultivadas *in vitro*, quando estas permaneciam em um mesmo meio de cultura por mais de 4 semanas. Os segmentos nodais apresentavam poucas gemas, com crescimento severamente prejudicado, possivelmente causado pela redução dos nutrientes no meio de cultura. Manders, et al. (1994) relataram que o aumento da concentração de FeEDTA do meio MS, durante a fase de crescimento das gemas derivadas de discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, foi benéfico para prevenir a clorose das gemas ou plântulas.

Alterações na concentração e fonte de nitrogênio do meio de cultura MS influenciaram na formação de gemas provenientes de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa*. A multiplicação das gemas foi severamente reduzida quando a proporção de NO_3^- : NH_4^+ foi de 1:16, ou vice versa (Faria & Segura, 1997b).

Além de necessários para o crescimento das plântulas *in vitro*, a presença ou ausência de alguns elementos minerais, pode estar indiretamente relacionada a outros processos que ocorrem durante o cultivo *in vitro*.

Células e tecidos vegetais produzem etileno, o qual é acumulado pelas condições de cultivo *in vitro*. O acúmulo deste gás, é geralmente um fator prejudicial que deve ser evitado. Diversos fatores químicos e ambientais são conhecidos para inibir a ação do etileno, embora a intensidade do seu efeito varie conforme a espécie e tecido cultivados (Biddington, 1992; Reid, 1995).

O efeito do íon Co (cobalto) em plantas de *P. mollissima*, *Saintpaulia ionantha*, e *Brassica oleracea*, cultivadas *in vitro*, foi estudado por Bartolo & Macey (1989). A ausência de Co no meio de cultura causou, em *P. mollissima*, a redução do desenvolvimento, abscisão foliar, vitrificação e senescência das plântulas, as quais não sobreviveram por mais de 3 meses nesta condição. Estes sintomas foram semelhantes em *Brassica*. O íon Co parece estar relacionado à inibição da enzima responsável pela síntese do etileno. Alguns sintomas de deficiência de Co (desenvolvimento reduzido e clorose) são coincidentes com os sintomas causados pelo acúmulo excessivo deste gás, ocorrendo formação de etileno na ausência de cobalto (Abeles, 1973).

Faria & Segura, (1997a) estudaram os efeitos da adição de tiosulfato de prata (STS) e alterações nos nutrientes minerais na indução de organogênese em hipocótilo e discos de folha de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Avaliaram doses e fontes de nitrogênio (NO^{3-} e NH^{4+}), meios de cultura MS e WPM (Lloyd and McCown, 1980) e efeito do STS como inibidor da síntese de etileno, desfavorável à morfogênese. Os autores observaram a superioridade do meio MS em relação ao meio WPM, por apresentar maior concentração de NO^{3-} e NH^{4+} . Resultados satisfatórios foram obtidos nos meios de cultura contendo ambas as fontes de nitrogênio, sendo este nutriente, o mais exigido pelas culturas em crescimento *in vitro*, influenciando na atividade metabólica e na morfogênese de tecido. A adição do STS (8,8 μM) favoreceu o aumento da formação de gemas adventícias nos discos foliares, reduzindo o acúmulo de etileno.

Avaliações da influência do meio de cultura no crescimento e desenvolvimento de gemas durante a multiplicação de espécies de eucalipto foram realizadas por Correia (1993). O cultivo dos explantes de *E. grandis*, em meio de cultura líquido, apresentou maiores valores para peso de matéria fresca (PMF) e seca (PMS) em relação ao meio sólido. O agente solidificante (ágar), pode ter dificultado os processos de difusão e absorção de nutrientes, reduzindo o crescimento dessas culturas. Entretanto, clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, cultivados em meio líquido, apresentaram vitrificação (hiperhidria) e, os valores de PMS, foram inferiores àqueles observados em meio sólido. A autora sugere que o crescimento *in vitro* desses explantes pode ser influenciado pela concentração iônica do meio de cultura, como também ser dependente da capacidade de difusão do meio e assimilação dos nutrientes pelas gemas ou plântulas.

Estudos sobre adequação nutricional do meio de cultura para crescimento de gemas de *Eucalyptus saligna* Smith foram realizados por Grossi (1995). Alterações na composição do meio de cultura MSA, para *E. saligna*, foram realizadas e o meio modificado foi denominado MSA-1. Neste, as

concentrações de N-total e de NO_3^- foram aumentadas, e a de NH_4^+ reduzida, em relação ao MSA. A concentração de Fe também foi aumentada e, os demais micronutrientes, não foram alterados. A produção de matéria seca (PMS) no meio de cultura MSA-1, foi maior (110,91 mg) que aquela do meio MSA (96,17 mg). O autor observou que, em relação a PMS, o meio MSA-1 foi mais favorável que o MS para o cultivo de 87,5% dos genótipos de *E saligna* testados. Sintomas de hiperhidria foram observados com maior frequência nos explantes cultivados em meio MS.

Visando adequar o meio de cultura para bananeira (*Musa* sp. AAB) cv. prata anã, Diniz (1996) estudou a absorção dos nutrientes minerais, em função do período de tempo de cultivo dos explantes, em meio MS. Observou-se maior taxa de absorção dos nutrientes durante os primeiros 20 dias, com exceção do Mn. Entre os macronutrientes, o K foi absorvido em maior quantidade, seguido do N e Ca e, entre os micronutrientes, o Fe foi o nutriente mais extraído do meio de cultura. O P foi mais rapidamente absorvido pelos explantes e sua absorção foi relacionada com a absorção de S, Zn e B. A autora observou alterações nos valores do pH, havendo brusca mudança durante os primeiros 4 dias de cultivo, de 5,61 para 4,18, estabilizando em torno de 4,0. Com o objetivo de proporcionar melhores condições nutricionais para o desenvolvimento dos propágulos, considerou-se adequado o intervalo entre os subcultivos aos 30 dias.

3. UM NOVO MÉTODO PARA DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MEIO DE CULTURA PARA MICROPROPAGAÇÃO DE MARACUJÁ AZEDO (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

3.1. RESUMO

Sintomas de deficiência mineral foram observados em folhas de plântulas de maracujá azedo desenvolvidas em meio MS contendo 1,0 mg/L de GA₃. Inicialmente, as plântulas apresentaram clorose internerval, seguida de amarelecimento das folhas e crescimento reduzido. Análise foliar foi feita e os resultados obtidos foram comparados aos níveis de nutrientes considerados adequados para a espécie, na literatura. Diversas modificações foram feitas na composição do meio MS, considerando as deficiências minerais observadas, principalmente de Fe, Mg e Ca, e possível toxidez de Cl. O equilíbrio químico do meio de cultura modificado foi determinado pelo programa Geochem (Sposito & Mattigod, 1980) e os ajustes finais foram feitos para garantir a disponibilidade dos nutrientes. A eficiência do meio modificado (MSM) foi testada através do cultivo de segmentos nodais em ambos os meios, MS ou MSM, acrescidos de 3,0 mg/L de BAP. Após três subcultivos, foi feita a análise foliar das plântulas. A deficiência mineral foi observada nas plântulas cultivadas em meio MS, enquanto aquelas cultivadas em meio MSM, apresentaram folhas verdes e crescimento superior. Os resultados da análise foliar, em ambos os meios, mostraram um aumento considerável nas quantidades de Ca, Cu, Fe, Mg e S e redução nos níveis de B e Cl nas plântulas cultivadas no meio modificado. Um

pequeno aumento ou redução nos níveis de outros elementos também foi observado. Subcultivos de plântulas cloróticas em meio modificado (MSM) mostraram o desaparecimento dos sintomas de deficiência mineral em 2 ou 4 semanas.

3.2. SUMMARY: A NOVEL APPROACH FOR THE DEFINITION OF THE INORGANIC MEDIUM COMPONENTS FOR THE MICROPROPAGATION OF YELLOW PASSIONFRUIT (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

Mineral deficiency symptoms were observed in leaves of yellow passionfruit plantlets growing in MS medium with 1.0 mg/L GA₃. Initially, plantlets had interveinal chlorosis, followed by bleaching of the leaves and retarded growth. Leaf mineral analysis was done and the results compared to the mineral requirements suggested for passionfruit in the literature. Several modifications were made to the composition of MS medium, taking into account the mineral deficiencies, mainly of Fe, Mg and Ca, and possible toxicity of Cl. The chemical equilibrium was checked using the software Geochem (Sposito & Mattigod, 1980) and final adjustments were made to ensure good availability of minerals. The efficiency of the modified medium (MSM) was tested by culturing nodal segments in both MS or MSM, supplemented with 3.0 mg/L BAP. After three subcultures mineral analysis of the leaves was done. At that stage, severe mineral deficiency was observed in the plantlets cultured in MS medium, while plantlets cultivated in the adjusted medium had green leaves. The results of the mineral analysis of plantlets in both media showed a fairly large increase in Ca, Cu, Fe, Mg and S and decrease in the levels of B and Cl in plantlets cultivated in the adjusted medium. A slight increase or decrease in the other elements was also observed. Subculture of the chlorotic plantlets to the adjusted medium (MSM) showed that the visual symptoms of mineral deficiency disappeared in two to four weeks.

3.3. INTRODUÇÃO

Sistemas de cultivo *in vitro* dependem do equilíbrio de uma série de fatores, como reguladores vegetais, luz, temperatura, pH, nutrientes minerais do meio de cultura, entre outros. Os nutrientes minerais são responsáveis por funções específicas no metabolismo vegetal, fazendo parte de proteínas, aminoácidos, organelas e estruturas, como também participam de reações enzimáticas, potencial osmótico, etc. As deficiências minerais nas plantas provocam distúrbios no metabolismo, que se manifestam na forma de alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, conforme o nutriente e o nível de deficiência.

A micropropagação ou cultivo *in vitro* do maracujazeiro é geralmente conduzida em meio de cultura MS completo, ou contendo a metade da concentração dos sais minerais (Kantharajah & Dodd, 1990; Dornelas & Vieira, 1994; Manders et al., 1994; Kawata et al., 1995). Sintomas de deficiência mineral *in vitro* foram relatados por Kantharajah & Dodd (1990), durante a multiplicação de plantas de *Passiflora edulis*, a partir de segmentos nodais. Os explantes cultivados em meio por mais de 4 semanas, tornavam-se pouco produtivos, apresentando clorose, geralmente seguida por senescência. Moran Robles (1978) utilizou diferentes condições de cultivo para *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. mollissima* e observou que a composição dos meios de cultura era responsável por diferenças na porcentagem de crescimento de gemas e enraizamento. Faria & Segura (1997a) observaram a influência da fonte de nitrogênio e adição de tiosulfato de prata durante a indução de gemas adventícias a partir de hipocótilo e discos de folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Em experimentos realizados neste laboratório, observou-se severa deficiência mineral em plântulas regeneradas a partir de discos de folha de *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivadas em meio MS completo ou em meio contendo a metade da concentração dos sais. A deficiência era caracterizada por clorose internerval ou amarelecimento generalizado das folhas e crescimento reduzido.

De acordo com os sintomas de deficiência descritos para maracujazeiro por Ruggiero et al. (1996), a deficiência mineral apresentada seria, provavelmente, de Fe, Mg ou Ca.

Com o objetivo de promover melhores condições de crescimento para a multiplicação de plântulas de maracujá azedo *in vitro*, este trabalho propõe uma adequação da composição mineral do meio de cultura, visando otimizar seu crescimento, baseando-se nos teores de nutrientes encontrados em folhas de plantas com de 10 meses de idade, cultivadas em campo. Para testar a eficiência do meio modificado (MSM), foi feita a micropropagação de *P. edulis* f. *flavicarpa* em meio MS e em MSM, realizando-se a análise foliar das plântulas após três subcultivos.

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1. Cálculo dos teores dos nutrientes

Através da experiência no cultivo de diversas espécies *in vitro*, Gonçalves e Higashi (comunicação pessoal) determinaram que, em média, culturas micropropagadas devam produzir 15 g de matéria seca, em 21 dias, com um litro de meio de cultura. Para definir a composição mineral do meio de cultura, estabeleceu-se a concentração de cada elemento no meio, proporcional à sua concentração nas folhas jovens de plantas saudas, em campo (Tab. 1). A equação 1 mostra a fórmula utilizada para o cálculo da concentração dos elementos inorgânicos do novo meio de cultura:

$$EM = \frac{EF \times 15}{1000} \quad (1)$$

Onde: EM = concentração do elemento inorgânico no meio de cultura (g/L)

EF = concentração do elemento inorgânico em folhas de plantas jovens sadias (g/kg)

Tabela 1. Teores totais de macro e micronutrientes em folhas plantas de maracujá azedo, em campo, com 10 meses.

Nutrientes	Reuter & Robinson, 1997	Malavolta et al., 1997
	g/kg	
N	42,5-52,5	40-50
P	1,5-2,5	4-5
K	20-30	35-45
Ca	17,5-27,5	15-20
Mg	3-4	3-4
S	2-4	3-4
	mg/kg	
B	40-50	40-50
Cu	5-20	10-20
Fe	100-200	120-200
Mn	100-500	400-600
Zn	50-80	25-40
Cl	<20	-

Este cálculo foi feito para todos elementos minerais, baseando-se nos níveis de nutrientes foliares de plantas de maracujá azedo, cultivadas em campo, com 10 meses de idade (Tab. 1). Com a quantidade de cada elemento químico definida, determinou-se a quantidade total de cada componente do meio de cultura (sais minerais). O equilíbrio químico do novo meio de cultura, denominado MSM, foi ajustado pelo programa Geochem (Sposito & Mattigod,

1980). Ajustes finais foram feitos para que os nutrientes estivessem prontamente disponíveis para as plântulas. A solução nutritiva utilizada durante a fase de aclimação foi definida pelo mesmo processo, utilizando-se tabelas de adubação como referência para determinar a quantidade necessária dos nutrientes.

3.4.2. Eficiência do meio de cultura modificado (MSM)

Foi feita a multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, cultivadas em casa de vegetação. Os segmentos foram desinfestados com solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), 3:1, e em seguida, lavados com água esterilizada, em câmara asséptica. O cultivo foi feito em meios MS e MSM, acrescidos de vitaminas de MS, 30 g/L sacarose, 2,0 g/L phytigel e 3,0 mg/L BAP (6-benzilaminopurina), sendo o pH ajustado a 5,8. Os meios de cultura foram vertidos em recipientes Magenta (GA7) e autoclavados a 120 °C, a 1 atm, durante 20 minutos. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 ± 2 °C, subcultivadas a cada 4 semanas (Figura 1a-b). Após 3 subcultivos, foram coletadas folhas das plântulas cultivadas em ambos os meios de cultura, colocadas para secar em estufa por 48 horas a 45 °C e enviadas para análise mineral ao Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas (ESALQ/USP). Após 3 ciclos em meio MS, algumas plântulas com sintomas de deficiência mineral foram transferidas para meio MSM para observação do efeito deste meio na recuperação das plântulas.

3.4.3. Preparo de material para análise ao microscópio eletrônico de varredura

Segmentos foliares com ou sem sintomas de deficiência mineral foram coletados e preparados para análise em microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram fixadas em glutaraldeído (2% em 0,2M cacodilato de sódio),

desidratadas em etanol e secas ao ponto crítico através de CO₂ líquido, de acordo com Rodriguez e Wetzstein (1998). O material foi coberto com ouro e observado em microscópio Zeiss (DSM 940A) operando entre 10-15 kV. Micrografias foram obtidas através de filme neopan 120SS, de granulação fina.

3.4.4. Alongamento e aclimação das plantas

Parte das plântulas desenvolvidas em meio MSM ou MS foram transferidas para meio MSM acrescido de 1,0 mg/L de GA₃ (ácido giberélico) para alongamento. Foram subcultivadas a cada 4 semanas, sob 16 horas de fotoperíodo, a 27 ± 2 °C.

As plântulas, com cerca de 5 cm de altura, foram lavadas em água corrente e, em seguida, colocadas em copos descartáveis de 500 mL, perfurados na base, contendo vermiculita ou substrato irrigados com solução nutritiva. Inicialmente, os copos contendo as plantas foram cobertos com sacos plásticos transparentes, os quais foram sendo abertos gradativamente. Após cerca de 30 dias, os plásticos foram retirados dos copos. As plantas foram irrigadas semanalmente com solução nutritiva.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados finais do ajuste dos elementos do meio de cultura (Tab. 2), mostraram que as principais diferenças entre os meios MS e MSM foram no aumento da concentração de P, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Na e EDTA, e na redução da concentração de Zn, Cl e I. A composição dos meios de cultura MS e MSM e a disponibilidade de cada elemento, calculados através do programa Geochem (Sposito & Mattigod, 1980) são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Pode-se observar que os nutrientes minerais (sais) do meio MSM são praticamente os mesmos do MS (Tab. 3). O nitrato de cálcio foi utilizado no meio de cultura MSM como fonte de cálcio, substituindo o cloreto de

cálcio do meio MS. O equilíbrio químico dos elementos mostra que elevada porcentagem de cada elemento está disponível, em sua forma química preferencial, similarmente ao observado no meio MS (Tab. 4).

Tabela 2. Elementos minerais dos meios MS e MSM e da solução nutritiva, utilizados para cultivo *in vitro* e aclimatação do maracujá azedo.

Elementos Minerais	MS mg/L	MSM	Sol. Nutritiva
N	840,6	714,5	193,05
P	38,71	61,94	21,68
K	783,95	664,7	187,68
Ca	120,24	220,44	75,7
Mg	36,46	60,77	20,66
S	54,5	92,17	30,95
B	1,08	0,76	0,4
Fe	5,58	11,17	5,58
Zn	1,96	0,653	0,06
Mn	3,84	8,8	0,76
Mo	0,095	0,095	0,015
Co	0,006	0,006	0,004
Cu	0,006	0,317	0,038
I	0,63	-	-
Cl	212,7	0,007	0,005
Na	4,64	9,24	0,59
EDTA	29,22	58,45	29,22

Tabela 3. Composição dos meios de cultura MS e MSM e da solução nutritiva, utilizados durante o cultivo *in vitro* do maracujá azedo e a fase de aclimação.

Nutrientes Minerais	MS	MSM	Sol. Nutr.
	mg/L		
NH ₄ NO ₃	1650,0	1000,0	237,0
KNO ₃	1900,0	1520,0	490,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	83,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	1300,0	270,0
KH ₂ PO ₄	170,0	272,0	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	616,0	210,0
H ₃ BO ₃	6,2	4,5	2,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	28,0	2,36
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2,9	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,25	0,16
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,04
KI	0,83	-	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	33,6	74,84	37,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	55,6	27,8
Ácido Nicotínico			
(mg/L)	0,5	0,5	-
Piridoxina (mg/L)	0,5	0,5	-
Tiamina (mg/L)	0,1	0,1	-
Glicina (mg/L)	2,0	2,0	-
Mio-inositol	100,0	100,0	-
Sacarose (g/L)	30,0	30,0	-
Phytigel (g/L)	2,0	2,0	-

Tabela 4. Distribuição dos cátions e ânions resultantes do cálculo do equilíbrio químico dos meios de cultura MS e MSM, obtidos através do programa Geochem (Sposito & Mattigod, 1980).

Cátions/Ânions	MS		MSM	
	%*	mg/L	%*	mg/L
Ca ²⁺ (livre)	82,7	99,43	82,2	181,20
Mg ²⁺ (livre)	89,4	32,59	88,0	53,47
K ⁺ (livre)	97,3	762,78	97,4	647,41
Na ⁺ (livre)	98,0	4,54	97,9	9,04
Fe ²⁺ (EDTA)	38,1	2,12	58,0	6,47
Mn ²⁺ (livre)	64,8	2,48	47,7	4,19
Cu ²⁺ (EDTA)	100,0	0,006	100,0	0,317
Zn ²⁺ (EDTA)	100,0	1,96	100,0	0,653
Co ²⁺ (EDTA)	98,7	0,0059	99,4	0,0059
SO ₄ ²⁻ (livre)	88,4	48,17	75,1	69,22
Cl ⁻ (livre)	99,1	210,78	98,3	0,0068
I ⁻ (livre)	100,0	0,63	---	---
N (livre)	99,0	832,19	99,0	707,35
PO ₄ ³⁻ (H ⁺)	92,4	35,77	82,8	51,28
B(OH) ₄ ⁻ (H ⁺)	99,8	1,077	99,8	0,758
MoO ₄ ²⁻ (livre)	38,6	0,0366	1,6	0,0015
MoO ₄ ²⁻ (Ca ²⁺)	2,3	0,0021	94,8	0,09
MoO ₄ ²⁻ (Mg ²⁺)	58,5	0,0555	3,6	0,0034

* % da quantidade total dos elementos.

Os segmentos nodais cultivados em meio de cultura MS ou MSM acrescido de 3,0 mg/L de BAP apresentavam após 30 dias, diversas gemas adventícias na região axilar da folha geralmente ocorrendo abscisão do segmento de pecíolo do explante (Fig. 1a). No primeiro subcultivo as gemas foram separadas do explante e transferidas para o mesmo meio de cultura (Fig. 1b).

Após 3 subcultivos em meio de cultura MS ou MSM, observou-se que as plântulas em meio MS apresentaram sintomas de deficiência mineral (amarelecimento) e crescimento reduzido. As plântulas cultivadas em meio modificado, MSM, apresentaram folhas verdes e maior crescimento. Plântulas cultivadas em meio MS (Fig. 1c) foram transferidas para o meio MSM recuperaram a coloração verde das folhas, após 2 ou 4 semanas (Fig. 1d).

A análise foliar das plântulas desenvolvidas em ambos os meios de cultura (Tab. 5) confirma a hipótese inicial de deficiência de Fe, Ca e Mg, mostrando níveis destes elementos muito baixos nas plântulas cultivadas em meio MS. Os níveis de Fe e Mg do meio MSM estão na faixa considerada adequada para esta espécie (Tab. 1). Outra evidência do restabelecimento dos níveis de Fe no meio de cultura modificado (MSM), foi a proporção de K/Ca, sendo 6,22 neste e, 11,6 no meio MS. De acordo com Malavolta et al. (1997), uma das características da deficiência de Fe é a alta relação K/Ca.

Os níveis de Ca dobraram no meio de cultura MSM em relação aos do meio MS (Tab. 5), mas ainda não atingiram a faixa adequada (Tab. 1). Sintomas de deficiência de Ca, entretanto, não foram visualmente detectados em plântulas desenvolvidas em meio MSM. É importante considerar que, sob condições *in vitro*, a alta umidade pode interferir na absorção de Ca, que ocorre passivamente.

Figura 1. Micropropagação de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. a) segmentos nodais em meio MSM contendo 3,0 mg/L BAP, após 21 dias; b) multiplicação das plântulas em MSM durante o segundo subcultivo; c) plântula, em meio MS, mostrando deficiência mineral, com clorose internerval; d) plântula, 2 semanas após transferência do meio MS para meio MSM, apresentando recuperação das condições nutricionais; e) plantas aclimatadas, em casa de vegetação; f) planta mostrando vasto sistema radicular, formado em substrato de vermiculita, ainda aderida às raízes.

Tabela 5. Análise mineral das folhas de maracujá azedo, cultivado *in vitro*, nos meios de cultura MS e MSM, após 3 subcultivos.

Elementos Minerais	MS	MSM
	g/kg	
N	52,15	48,44
P	4,51	5,00
K	53,8	58,4
Ca	4,64	9,38
Mg	1,92	2,96
S	2,61	3,48
	mg/kg	
B	47	22
Cu	5	10
Fe	62	109
Mn	169	170
Zn	56	47
Cl	7100	300
Na	1288	1196

Embora a toxidez de Cl não tenha sido detectada em plantas cultivadas em meio MS, a alteração da fonte de cálcio, de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) para nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], reduziu drasticamente os níveis de cloro nas folhas das plântulas. Bould et al. (1983), observaram necrose marginal, seguida de amarelecimento precoce e abscisão das folhas de morangueiro em meio de cultura com alta concentração de Cl.

Pela análise das amostras foliares em microscópio eletrônico de varredura (Fig. 2), observaram-se danos na estrutura da epiderme foliar, no limbo e nervuras de folhas de plântulas que apresentavam sintomas de deficiência nutricional. Folhas sadias (Fig. 2d) apresentaram células com maior conexão e turgidez. Entretanto, células epidérmicas de folhas deficientes (Fig. 2c) apresentaram aspecto rugoso, sugerindo a redução do protoplasma celular.

Morales-Abanto & Müller (1977b) analisaram cortes histológicos de folhas de *P. edulis* com sintomas de deficiência de Mg, Ca e S, observando deformações nas células e nos cloroplastos. Nas folhas com deficiência de Ca, diversos estágios de deformações celulares foram observados. Os tecidos dos parênquimas paliçádico e lacunoso apresentaram aspecto de uma massa celular indefinida, sendo que somente o sistema vascular apresentava-se definido entre as camadas epidérmicas (abaxial e adaxial). Nas folhas deficientes em Mg, células do parênquima paliçádico mostraram severas deformações, os cloroplastos de todo o mesófilo estavam aderidos à parede celular, agrupados em massas irregulares. Células de folhas de plantas deficientes em Fe (Morales-Abanto & Müller, 1977a) mostraram um parênquima paliçádico pouco desenvolvido, com células pequenas, parênquima lacunoso compacto e número de cloroplastos reduzido.

A deficiência de certos elementos minerais pode também afetar a morfogênese, como foi observado por Pedroso & Pais (1995) em *Camellia japonica*. A indução de embriogênese somática a partir de tecido foliar foi dependente da disponibilidade de Ca no tecido do explante. Para utilização de plantas cultivadas *in vitro* como fonte de explantes, plantas bem nutridas podem ser de importância significativa para indução de organogênese ou embriogênese somática.

Os subcultivos das plântulas para meio fresco, MSM acrescido de 1,0 mg/L de GA₃, permitiram o crescimento das gemas formadas a partir dos discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa*. O processo de aclimação, com abertura gradual do saco plástico que cobria as plantas, foi satisfatório. O uso da solução nutritiva descrita na Tabela 2 mostrou-se bastante adequado para o crescimento das plantas, que se apresentaram bem vigorosas e sem sintomas de deficiência mineral (Fig. 1e). O sistema radicular das plantas desenvolveu-se adequadamente tanto em vermiculita como em substrato (Fig. 1f).

Figura 2. Face adaxial de segmentos foliares de plântulas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, sem sintomas de deficiência mineral (a,b) ou mostrando severos sintomas de deficiência (c,d), observados em microscópio eletrônico de varredura. Barras = 50 m (a,c) e 20 m (b,d).

3.6. CONCLUSÕES

O meio de cultura modificado, MSM, foi definido para o cultivo *in vitro* de maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*). O método utilizado para o ajuste do meio de cultura, baseado nos níveis de nutrientes considerados adequados para esta espécie, em plantas cultivadas em campo, com 10 meses de idade, mostrou-se eficiente para a determinação da concentração dos elementos no meio de cultura. A eficiência do meio modificado (MSM) foi confirmada pela avaliação visual das plantas cultivadas em meio MS e MSM e pela análise mineral das folhas. A solução nutritiva, preparada pelo mesmo método, também apresentou resultados satisfatórios. O processo utilizado para definir o meio de cultura MSM pode ser também utilizado para a definição de meio adequado para outras espécies ou mesmo cultivares.

4. EFEITO DE BENZILAMINOPURINA E THIDIAZURON EM DISCOS DE FOLHA DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* CULTIVADOS *IN VITRO*

4.1. RESUMO

Sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e de maracujá doce (*P. alata*) foram germinadas em casa de vegetação. Folhas jovens foram coletadas e discos foliares foram cultivados em meio de cultura MS acrescido de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) ou thidiazuron (TDZ), em diferentes épocas do ano. As culturas foram mantidas a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro, durante 4 semanas. Após a indução, foram feitos subcultivos mensais em meio MSM (Capítulo 3) contendo 1,0 mg/L de GA_3 para alongamento das gemas e enraizamento. Os resultados mostraram que ambos os reguladores de crescimento foram eficientes para indução de gemas adventícias a partir de discos foliares de maracujá azedo. Além da formação de gemas, os explantes de maracujá azedo apresentaram proliferação de uma massa de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos, principalmente nos tratamentos contendo TDZ, com pequena frequência nos tratamentos com BAP. As culturas de maracujá doce tiveram comportamento ligeiramente distinto pois, estruturas globulares foram formadas em tratamentos contendo BAP e TDZ, associadas com a proliferação de calo e formação de gemas adventícias. A resposta organogênica mostrou-se diferenciada conforme

a época de coleta dos explantes, nas quais as plantas fornecedoras de explantes são mantidas em casa de vegetação.

4.2. SUMMARY: EFFECT OF BENZYLAMINOPURINE AND THIDIAZURON IN LEAF DISCS OF *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* AND *P. alata* CULTIVATED IN VITRO

Seeds of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and sweet passionfruit (*Passiflora alata*) were germinated in the greenhouse. Young leaves were collected and leaf discs cultured in MS medium supplemented with different levels of either benzylaminopurine (BAP) or thidiazuron (TDZ), at different months of the year. Cultures were maintained at 27 ± 1 °C in the dark for four weeks followed by monthly subcultures into MSM (Chapter 3) medium with 1.0 mg/L GA₃ for shoot elongation and rooting. The results showed that both growth regulators were efficient for adventitious shoot induction from leaf discs of yellow passionfruit. In addition, yellow passionfruit explants showed proliferations of globular structures which resembled globular somatic embryos, mainly in treatments with TDZ and with small frequency in treatments with BAP. Cultures of sweet passionfruit had a slightly different behaviour, in that the globular structures were formed in cultures with both BAP and TDZ, always interspersed with some callus proliferation and adventitious shoot formation. The organogenic response seems to vary according to the time of the year when the explants are collected, apparently related to the environmental conditions in which the seedlings are maintained (greenhouse).

4.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* apresenta um grande número de espécies economicamente importantes, sendo cultivadas para diferentes fins. As espécies, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, apresentam grande

importância econômica pela comercialização dos frutos *in natura* e do suco concentrado (*P. edulis* f. *flavicarpa*). O cultivo *in vitro* destas espécies torna-se importante tanto para a multiplicação de clones com características superiores, como para a aplicação das técnicas de transformação genética e hibridação somática, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento da cultura.

A micropropagação dessas espécies de *Passiflora*, pode ser obtida através de explantes de tecidos jovens como cotilédones, hipocótilo, folhas e segmentos nodais (Moran Robles, 1979; Baccarin, 1988; Drew, 1991; Faria & Segura, 1997b). A indução de gemas a partir de explantes foliares foi relatada por Dornelas & Vieira (1994), Kawata et al., (1995); Monteiro et al. (1996) e Faria & Segura (1997a).

A maior parte dos trabalhos com espécies desse gênero visando a indução de organogênese, utilizam a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) como principal regulador vegetal, em diferentes explantes. O BAP, em baixa concentração, e combinado com auxinas como 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (Zheng et al., 1996; Rinaldi, 1999), IAA (ácido indolilacético) (Murthy et al., 1996a) ou NAA (ácido naftalenoacético) (Rodriguez & Wetzstein, 1998), é também utilizado em trabalhos para indução de embriogênese somática em outras culturas. Zheng et al., (1996) estabeleceram um sistema eficiente para regeneração de plantas de batata doce (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)), a partir de explantes foliares utilizando combinações de BAP e 2,4-D. Entretanto, Afza et al. (1996), trabalhando com *Ensete ventricosum*, espécie herbácea da família Musaceae, observaram a formação de embriões somáticos nos explantes cultivados em meio de cultura contendo BAP, sem adição de auxina.

Thidiazuron (TDZ) é outro regulador vegetal que vem sendo utilizado para indução de organogênese e embriogênese somática, um composto que apresenta estrutura e efeitos semelhantes aos das citocininas (Mohamed et al., 1992). Estes autores observaram, em explantes de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*), que os tratamentos contendo TDZ foram muito superiores àqueles contendo BAP. Este efeito também foi observado por Murthy et al.

(1996b) em sementes de grão de bico (*Cicer arietinum* L.). Verificaram a superioridade do TDZ em relação ao BAP, quanto ao número de explantes responsivos e número de gemas formadas por explante. A associação de L-prolina com TDZ promoveu a formação de embriões somáticos em nó cotiledonar de seedlings. Organogênese a partir de explantes foliares de plântulas *in vitro* de *Fagus orientalis* foi obtida por Cuenca & Vieitez (1999). Combinações de TDZ com IAA, promoveram o início de formação de gemas adventícias.

Infórmers são os fatores que influem na resposta morfogênica *in vitro*, seja na indução de gemas adventícias ou de embriões somáticos a partir de explantes vegetais. Estes fatores podem estar relacionados às características genéticas da espécie, tipo de explante, meio de cultura, reguladores ou mesmo fatores que antecederem o cultivo *in vitro*. Hvoslef-Eide (1991) observou em *Nephrolepis exaltata* que tratamentos com diferentes temperaturas em plantas fornecedoras de explantes influenciam o comportamento das plântulas, após diversos ciclos de cultivo *in vitro*. O aumento da temperatura nas plantas-mãe promoveu aumento no crescimento *in vitro* das respectivas plântulas.

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver um protocolo de regeneração de plantas através de organogênese a partir de discos de folhas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, que possam ser utilizados em trabalhos de transformação genética dessas espécies. A caracterização da resposta morfogênica *in vitro* em explantes de ambas as espécies é apresentada através da análise histológica e morfológica.

4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1. Explante

As plantas para a obtenção dos explantes foram provenientes de sementes de maracujazeiro azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), fornecidas pelo

Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAVJ/UNESP). As sementes de maracujá doce foram obtidas no mercado local. Para germinação, as sementes foram colocadas em vasos contendo substrato umedecido (Plantmax), misturado a húmus de minhoca (3:1).

Foram utilizados como explantes, discos de folhas novas de plantas de maracujá azedo e maracujá doce recém germinadas, em casa de vegetação. As folhas foram obtidas de brotações novas, medindo aproximadamente 5 e 6 cm de comprimento para *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, respectivamente. A textura das folhas de ambas as espécies era tenra e encontravam-se em fase de expansão do limbo foliar. As folhas foram lavadas em água corrente e imersas em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), na proporção de 3:1 (água : hipoclorito), durante 20 minutos. Em seguida, foram feitas três lavagens com água esterilizada em câmara de fluxo laminar.

4.4.2. Meio de cultura e condições de cultivo

Para indução, utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol e 8,0 g/L de ágar. Diversas concentrações dos reguladores vegetais BAP (6-benzilaminopurina), TDZ (thidiazuron) ou KIN (cinetina) foram testadas. Como testemunha, utilizou-se o meio MS sem regulador de crescimento.

- BAP: doses de 0,6; 0,8; 1,0 mg/L;
- TDZ: 0,25; 0,50; 0,75 ou 1,0 mg/L;
- KIN: 0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L.

O pH do meio foi ajustado para 5,8, sendo autoclavado a 120 °C, por 20 minutos, a 1 atm. Os meios foram vertidos em placas de petri descartáveis de 9 cm de diâmetro (90 x 15 mm). Os discos foliares, de 5 mm de diâmetro, foram retirados das folhas com vazador e distribuídos ao acaso nas placas, com a face adaxial em contato com o meio de cultura, sendo 10 explantes por placa. A

orientação dos discos no meio de cultura foi definida em estudos anteriores por Monteiro et al. (1996). As culturas foram mantidas à temperatura de 27 ± 1 °C, em ausência de luz, durante 4 semanas. Foram realizados diversos experimentos, sendo instalados em diferentes épocas do ano, para ambas as espécies.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, onde cada bloco consistia de 11 tratamentos (BAP, KIN e TDZ), incluindo a testemunha. Para *P. edulis* f. *flavicarpa*, os experimentos foram instalados em 5 diferentes épocas do ano (5 blocos), exceto nos tratamentos contendo TDZ, que foram instalados em apenas 3 épocas (3 blocos). Os experimentos para *P. alata* foram instalados em 4 épocas (4 blocos) (Tab. 6). Cada tratamento consistia de 9 ou 12 repetições, cada repetição correspondendo a uma placa com 10 discos foliares. A análise estatística foi realizada através do programa SAS (1986), comparando-se médias dos explantes responsivos nos tratamentos que apresentavam resposta positiva (BAP e TDZ). Sendo o objetivo principal a definição da melhor resposta organogênica, independente do tipo de regulador vegetal, as análises foram realizadas considerando-se cada combinação regulador/dose como um tratamento.

Tabela 6. Experimentos instalados em diferentes épocas do ano para as espécies de maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e doce (*P. alata*).

Época	Espécie	
	M. azedo	M. doce
1 (set/97)	X	-
2 (mar-abr/98)	X	-
3 (mai/98)	X	-
4 (out-nov/98)	-	X
5 (dez/98)	-	X
6 (jan-fev/99)	X	X
7 (mar/99)	X	X

Após 4 semanas em meio de indução, com auxílio de microscópio estereoscópico, os discos foram avaliados, observando-se o número de explantes responsivos ou seja, aqueles que apresentavam formação de gemas adventícias.

4.4.3. Alongamento de gemas e aclimação das plântulas

As gemas formadas a partir dos discos foliares foram transferidas diretamente para meio de cultura de alongamento, MSM (Cap. 3), suplementado com 1,0 mg/L de GA₃ (ácido giberélico), em caixas Magenta (GA7). As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 2 °C, sendo subcultivadas a cada 4 semanas, até o enraizamento.

As plântulas obtidas, com cerca de 5 cm de altura, foram lavadas em água corrente. Em seguida foram colocadas em copos descartáveis, perfurados na base, contendo substrato irrigado com solução nutritiva (Cap. 3). Inicialmente, os copos contendo as plantas foram cobertos com sacos plásticos transparentes, os quais foram sendo abertos gradativamente. Após cerca de 30 dias, os plásticos foram retirados dos copos. As plantas foram periodicamente irrigadas com solução nutritiva.

4.4.4. Preparo de material para análise ao microscópio ótico

Amostras de segmentos foliares das regiões apresentando resposta morfogênica foram coletados após 3 ou 4 semanas de cultivo em meio de indução contendo BAP ou TDZ. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído (6%) e glutaraldeído (2%) em 0,2 M cacodilato de sódio, a pH 7,2. Foram desidratadas em uma série de 100% metil celosolve, etanol, propanol e butanol, seguido de imersão em meio de infiltração e emblocagem em Histoiresina. Os cortes histológicos foram corados com fucsina e azul de

toluidina (Rodriguez & Wetzstein, 1998) e observados em microscópio ótico invertido Zeiss Axiovert 35.

4.4.5. Preparo de material para análise ao microscópio eletrônico de varredura

Discos foliares de ambas as espécies, cultivados em meio contendo BAP ou TDZ foram fixados em solução de glutaraldeído 2% em 0,1 M tampão cacodilato, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (35% a 100%). Em seguida, foi feita secagem ao ponto crítico, através de CO₂. As amostras foram cobertas com ouro, sendo observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss (DSM 940A) operando entre 10 e 15 kV, no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de indução observou-se inicialmente, ligeiro intumescimento dos explantes de ambas as espécies e início de proliferação celular em alguns pontos nas bordas dos discos, originando calo ou gemas, nos tratamentos com BAP ou TDZ. Após 4 semanas da indução, no tratamento testemunha, não foi observada a regeneração de gemas nos discos de folhas em nenhuma das duas espécies. Nos tratamentos com KIN observou-se somente a formação de calo, diferindo daquele observado nos tratamentos com BAP ou TDZ. Nestes, o calo apresentava aspecto úmido e agregado, de coloração amarelada. Nos tratamentos com KIN o calo formado era esbranquiçado, bastante friável e com aparência mais ressecada. Gemas não foram observadas nos tratamentos com KIN, em nenhum dos blocos instalados para ambas as espécies.

Primórdios foliares foram observados em todos os tratamentos com BAP e TDZ para ambas as espécies, assim como a formação de calo e estruturas

embriogênicas. A resposta das duas espécies aos tratamentos com BAP e TDZ foram diferenciadas, principalmente na qualidade das gemas adventícias obtidas e subsequente crescimento.

4.5.1. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Observações visuais dos tratamentos com BAP e TDZ indicaram resposta diferenciada dos explantes, tanto em relação à época de coleta dos explantes, como em relação à distribuição das gemas adventícias nos explantes. Em todos os tratamentos observou-se formação de gemas tanto diretamente a partir do tecido do explante (Figs. 3a,b; 4f), como a partir de regiões onde proliferação celular era observada (3c; 4b,d,e). Pelas observações realizadas em microscópio estereoscópico, nos tratamentos com BAP as gemas formam-se em pequenos grupos, geralmente nas bordas dos discos foliares. Discos foliares cultivados em meio contendo TDZ também apresentaram gemas individualizadas (3d), ou em pequenos grupos, porém, frequentemente cobriam grande parte dos discos foliares (3e,f), estando ou não associadas à formação de calo. As gemas formadas nos tratamentos contendo BAP apresentavam-se ligeiramente mais desenvolvidas e melhor formadas, com primórdios foliares evidentes.

Em relação à média de explantes responsivos (Gráfico 1), os resultados da análise de variância mostraram diferenças significativas entre tratamentos e épocas. A interação entre os dois fatores (época x tratamento) também foi significativa, quando avaliou-se conjuntamente todos os tratamentos, indicando que a resposta dos explantes aos tratamentos varia em diferentes épocas. Realizando-se a análise separadamente para BAP e TDZ, porém, as interações (época x tratamento) não foram significativas, indicando que as respostas aos diferentes tratamentos seguem a mesma tendência em diferentes épocas. A interação significativa na análise conjunta de todos os tratamentos indica que o tipo de regulador (BAP ou TDZ) proporciona uma tendência diferenciada de

resposta. A instalação dos experimentos em blocos visou minimizar o efeito de época, o qual já havia sido observado em experimentos preliminares. Experimentos instalados em épocas de temperatura mais baixa resultavam em produção de gemas insignificante, ou mesmo nula nos explantes (dados não apresentados), desta forma procurou-se evitar essas épocas do ano. Pelo Gráfico 1 observa-se que os explantes induzidos em meio contendo BAP nas épocas do ano escolhidas, apresentaram pequena variação. Por outro lado, a média de explantes responsivos variou grandemente nos tratamentos com TDZ, sendo a época 3 significativamente diferente das outras duas épocas para as quatro doses de TDZ. Pela Tab. 7 podem-se observar as diferenças significativas (5%) na média de explantes responsivos entre tratamentos e entre épocas de coleta dos explantes.

Tabela 7. Número médio de discos foliares responsivos de *P. edulis* f. *flavicarpa* quando cultivados em meio contendo doses de BAP (0,6; 0,8 ou 1,0 mg/L, respectivamente B1, B2 ou B3) ou TDZ (0,25; 0,50; 0,75 ou 1,0 mg/L, respectivamente T1, T2, T3 ou T4), em cinco épocas do ano.

Tratamentos Épocas	B1	B2	B3	T1	T2	T3	T4
1	3,87 Aa	3,12 Aa	2,87 Ab				
2	2,79 Ca	4,55 Ba	6,23 Aa				
3	2,33 Ca	3,00 Ca	4,55 Bb	7,20 Aa	6,60 Aa	5,10 Ba	5,80 Aa
6	2,75 Aa	3,42 Aa	4,80 Aab	2,28 Bb	2,25 Bb	1,20 Bb	1,40 Bb
7	3,66 Aa	4,57 Aa	5,12 Aa	4,28 Ab	2,42 Bb	1,87 Bb	2,85 Bb

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas (5%) entre tratamentos em uma determinada época (linha) e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (5%) entre épocas em um determinado tratamento (coluna).

Figura 3. Cultivo *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* em meio contendo BAP ou TDZ. a-c) gemas adventícias induzidas em meio contendo BAP, formadas diretamente nos tecidos dos explantes (a,b) ou associada à proliferação de calo (c); d-f) resposta à indução com TDZ, onde gemas adventícias individualizadas eram formadas (d), ou discos repletos de gemas, associadas ou não a calos e estruturas globulares eram observados (e,f); g) gemas em fase de alongamento; h) plântulas enraizadas *in vitro*; i) plantas aclimatadas em casa de vegetação. Barras = 1 mm.

Figura 4. Cortes histológicos de explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados em meio contendo BAP (b-e, k, l) ou TDZ (a, f, g-j). a-f) gemas adventícias formadas a partir da proliferação de células nas bordas dos explantes (a-e), ou diretamente a partir do explante (f); g) formação de estruturas globulares (eg) associadas a calo na superfície do explante; h) gema adventícia formada em região de proliferação celular (pc), e estruturas semelhantes a embriões somáticos isolados (seta); i) agregado celular formando-se diretamente do explante, aparentemente desconectando-se do mesmo; j) duas estruturas formando-se a partir do explante, assemelhando-se a embriões somáticos (setas), com protoderme definida; k-l) embriões somáticos "destacados" dos explantes, mostrando protoderme bem definida e ápice meristemático (am). e = explante; pf = primórdios foliares. Barras = 100 μ m.

Gráfico 1. Resposta morfogênica dos discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados em meio de indução, contendo doses de BAP ou TDZ, em diferentes épocas do ano.

Através de avaliações visuais, observou-se que, durante os períodos mais quentes do ano, a resposta morfogênica dos discos é melhor em comparação aos períodos de temperaturas mais baixas, apresentando maior número de gemas ou estruturas globulares por explante. Alta proliferação de calos não organogênicos e reduzido número de gemas por explante foram observadas durante períodos de temperatura mais baixa. Acredita-se que as diferenças na porcentagem de explantes responsivos observadas entre épocas de coleta dos explantes estejam relacionadas a alterações no balanço hormonal endógeno nas folhas, provavelmente mediadas pelas condições ambientais na casa de vegetação. Hvoslef-Eide (1991) observou em *Nephrolepis exaltata* que diferentes tratamentos de temperatura em plantas fornecedoras de explantes influenciam o comportamento das plântulas, após diversos ciclos de cultivo *in vitro*. Assim, plântulas *in vitro* cujas plantas-mãe foram submetidas a condições de temperatura de 27 °C, apresentaram maior crescimento em relação àquelas plântulas originadas de plantas cultivadas sob 18-21 °C. A autora também observou os efeitos do comprimento do dia em relação à altura das plantas. Sob condições de dias longos, o aumento da temperatura causou redução do peso seco nas plântulas cultivadas *in vitro*. Em estudos posteriores, Hvoslef-Eide (1993), analisou a influência das condições ambientais nas plantas de *Cordyline fruticosa* (L.) fornecedoras de explantes e subsequentes plântulas cultivadas *in vitro*. A temperatura apresentou efeito significativo em relação ao número de gemas por explante desenvolvidas *in vitro*. A maior porcentagem de gemas desenvolvidas foi obtida na faixa de 18 a 20 °C para esta espécie. O comprimento do dia teve maior efeito no estabelecimento das culturas, sendo que, dias longos foram mais favoráveis.

A sensibilidade maior do TDZ às diferentes épocas pode ter ocorrido pelo seu modo de ação, aparentemente diferente daquele apresentado pelas citocininas tipo purinas, como BAP. Murthy et al. (1995) analisaram os níveis hormonais endógenos em explantes de amendoim (*Arachis hypogaea*) tratados com TDZ, observando alterações em citocininas, auxinas e ácido abscísico, e

concluindo que a resposta embriogênica foi obtida pelas alterações provocadas pelo TDZ nos níveis endógenos de auxinas. Victor et al. (1999), comparando os efeitos de BAP e TDZ em amendoim confirmaram o efeito do TDZ como modulador do metabolismo de auxina e citocinina endógenas. Em seus experimentos, os tratamentos com BAP induziram apenas formação de gemas. Segundo os autores, esses resultados confirmam a hipótese de Skoog e Miller de que a indução de gemas pelo BAP ocorre em resposta à elevada concentração exógena de citocinina, em relação ao baixo nível endógeno de auxina.

Após transferência das gemas para meio de alongamento, observou-se uma maior rapidez no crescimento das gemas induzidas em BAP em relação às induzidas em TDZ. Grande parte das gemas desenvolvidas em BAP cresciam e enraizavam (Figs. 3g,h). Huettelman & Preece (1993) afirmam que TDZ pode inibir alongamento de gemas e que em algumas espécies, fasciação de gemas é observada. Nos tratamentos com TDZ, mesmo naqueles onde um grande número de gemas era formado (Fig 3f), havia um menor aproveitamento das gemas, pois muitas delas não cresciam. Independente da taxa de regeneração, porém, plantas de maracujá azedo foram obtidas a partir de todos os tratamentos com BAP ou TDZ, sendo enraizadas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação (Fig. 3i).

Além da formação de gemas, observou-se com frequência a formação de calo e estruturas globulares de coloração amarelada associadas às gemas, principalmente nos tratamentos com TDZ, com pequena frequência nos tratamentos com BAP. Através de análises ao microscópio estereoscópico e eletrônico de varredura, observou-se a presença de estruturas globulares, semelhantes a embriões somáticos. Estas estruturas destacavam-se facilmente dos tecidos ou calos. Cortes histológicos mostraram a presença de estruturas globulares formando-se a partir de calo (Fig. 4g), ou a partir do tecido do explante (Fig. 4i). Essas estruturas se desenvolviam em embriões somáticos em estágio de coração ainda ligadas ao explante (Fig. 4j), ou destacando-se

facilmente e apresentando a formação de protoderme (Figs. 4h,j,k,l) e, em alguns casos, meristema apical (Fig. 4l). A transferência para meio de cultura contendo menor concentração ou ausência de reguladores vegetais não permitiu a conversão desses embriões em plantas.

4.5.2. *P. alata*

Os resultados observados para *P. alata* mostraram diferenças nas características das respostas dos explantes aos tratamentos. Observações visuais e com o auxílio de microscópio estereoscópico mostraram reduzido número de gemas/primórdios foliares e estruturas globulares nos explantes foliares de maracujá doce em meio contendo BAP, e abundante proliferação de calo de aparência compacta e esbranquiçada. Nos tratamentos com TDZ, observou-se a formação de gemas (Fig. 5a,b,j,k) associada a intensa formação de estruturas globulares nas bordas dos discos (Fig. 5d-f;k,m). A proliferação de calo nesses tratamentos foi reduzida, apresentando coloração amarelada e aspecto úmido.

Avaliando-se a média de explantes responsivos nos diferentes tratamentos instalados em quatro épocas distintas, observou-se que a análise de variância não mostrou interação significativa entre os fatores, havendo diferenças significativas somente dentro dos dois fatores (tratamento e época) (Tab. 8). Pelo gráfico 2 pode-se observar que as respostas aos diferentes tratamentos, nas diferentes épocas apresenta tendência semelhante.

Figura 5: Morfogênese a partir de discos de folha de *P. alata* cultivados *in vitro* com TDZ (a-l, k-m) ou BAP (j). a) disco de folha após 30 dias em meio contendo TDZ, mostrando predominância de desenvolvimento de gemas adventícias (seta) e calo; b) detalhe de formação de gemas adventícias associadas a outras estruturas, aos 30 dias em TDZ; c) gemas transferidas para meio de alongamento; d-f) estruturas globulares formadas a partir dos explantes aos 30 dias, possivelmente embriões somáticos, semelhantes ao da fig. 5l (seta); g-i) cortes histológicos de estruturas que se desprendem facilmente dos explantes, similares às observadas em d-f, possivelmente embriões somáticos em estágio coração, com protoderme definida, (seta) meristema apical incipiente (*); fusão de embriões na base (h); j-m) micrografias de MEV mostrando primórdios foliares (pf) em região de proliferação de calo (ca) (j); k) primórdios foliares associados a outras estruturas, possivelmente embriões somáticos (setas); l) embrião somático em detalhe, semelhante ao da fig. 5e; m) estruturas globulares e um possível embrião somático (seta). e = explante. Barras = 1mm; 100 μ m.

Gráfico 2. Resposta morfogênica dos discos foliares de *P. alata* cultivados em meio de indução contendo doses de BAP ou TDZ, em diferentes épocas do ano.

Tabela 8. Número médio de discos responsivos de *P. alata* quando cultivados em meios contendo doses de BAP ou TDZ, em quatro épocas do ano.

Tratamentos Épocas	B1	B2	B3	T1	T2	T3	T4
4	4,55 Aa	5,22 Aa	5,00 Aa	3,44 Aa	2,62 Ba	2,44 Ba	2,50 Ba
5	4,66 Aa	4,41 Aa	3,81 Aa	2,66 Ba	2,33 Ba	2,16 Ba	1,66 Ba
6	2,33 Ab	2,25 Ab	2,63 Ab	0,36 Bb	0,25 Bb	0,50 Bb	0,50 Bb
7	5,22 Aa	4,66 Aa	3,00 Bb	1,22 Bb	2,62 Ba	1,22 Ba	1,33 Ba

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas (5%) entre tratamentos em uma determinada época (linha) e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (5%) entre épocas em um determinado tratamento (coluna).

Após a transferência das gemas para meio de alongamento (Fig. 5c), não se obteve crescimento, em várias tentativas. Ao contrário das gemas de *P. edulis* f. *flavicarpa* que cresciam e enraizavam, as gemas de *P. alata* não cresciam e apresentavam amarelecimento. A ausência de crescimento pode ter sido causada por anormalidades ocorridas durante a formação das gemas adventícias. Gaba et al. (1999), descrevem o desenvolvimento de numerosas folhas sem a presença de gemas em cotilédones de melão induzidas por BAP. Nas Figs. 5j,k podem-se observar vários primórdios foliares. Cortes histológicos em amostras de *P. alata* não mostraram gemas com meristema apical.

A formação de embriões somáticos foi confirmada pelos cortes histológicos realizados em amostras de discos foliares de *P. alata* cultivados em meio com TDZ (Fig. 5g,h,i). A conversão desses embriões em plantas não foi obtida quando transferidos para meio de cultura MS sem regulador ou para meio MS acrescido de 60 g/L de sacarose.

Em experimentos anteriores, com ambas as espécies, foram testados outros reguladores visando a indução de embriogênese somática a partir dos discos foliares. Foram testados 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), NAA (ácido

naftalenoacético) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), nas concentrações de 10 ou 20 μM para indução de embriões somáticos. Em todos os tratamentos, foi também adicionado 1 μM de BAP (0,22 mg/L). Entretanto, sob as condições testadas, os testes apresentaram abundante formação de calos de coloração esbranquiçada e textura compacta. Apenas os tratamentos contendo 2,4-D apresentaram calos amarelados, não compactos, porém não apresentaram formação de estruturas embriogênicas. A transferência dos calos para meio de cultura sem regulador vegetal também não foi eficiente, sendo os calos formados considerados não embriogênicos.

4.6. CONCLUSÕES

BAP e TDZ, nas concentrações utilizadas, mostraram-se eficientes para a indução de gemas em *P. edulis* f. *flavicarpa*, observando-se diferenças na porcentagem de explantes responsivos em relação à época de instalação dos experimentos. Os mesmos tratamentos foram aparentemente eficientes para *P. alata*, porém plântulas não foram obtidas, indicando má formação das gemas, possivelmente com formação de primórdios foliares e ausência de meristema apical. Calos embriogênicos formaram-se em todos tratamentos, com maior frequência em explantes de *P. alata* cultivados em meio contendo TDZ. A presença de embriões somáticos foi confirmada através de cortes histológicos, porém não foi possível a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Variações na porcentagem de explantes responsivos e na via de regeneração podem ter ocorrido por diferença no balanço hormonal endógeno dos explantes causado, possivelmente, pelas condições ambientais a que as plantas fornecedoras de explantes estavam sujeitas. Estudos com plantas fornecedoras de explantes em condições ambientais controladas associadas a análises de hormônios endógenos poderão trazer contribuições à interpretação do efeito desses reguladores na morfogênese *in vitro* dessas espécies.

5. REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DE *Passiflora suberosa* L. A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

5.1. RESUMO

A regeneração *in vitro* de plantas de *Passiflora suberosa* foi obtida a partir de discos foliares. Folhas novas foram retiradas de plantas germinadas em casa de vegetação, imersas em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo; 3:1), durante 20 minutos. Discos foliares de 0,5 cm de diâmetro, com a face adaxial em contato com o meio de cultura, foram introduzidos em placa de petri. Organogênese foi obtida utilizando-se meio MS acrescido de 0,5 ou 1,0 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina). Após 4 a 8 semanas, observou-se formação de calos nas bordas dos discos foliares. Os calos formados foram transferidos para meio MSM, acrescido de 1,0 mg/L de GA₃ (ácido giberélico), sob fotoperíodo de 16 horas. Desenvolvimento de gemas adventícias foi obtido a partir dos calos, sendo estas alongadas e enraizadas no mesmo meio de cultura, após periódicos subcultivos, e aclimatadas em casa de vegetação.

5.2. SUMMARY: *IN VITRO* REGENERATION OF *Passiflora suberosa* L. PLANTLETS FROM LEAF DISCS

In vitro regeneration of plantlets was obtained from *Passiflora suberosa* leaf discs. Leaves from plants germinated in the greenhouse were collected and immersed in sodium hypochlorite solution (2.5% active chlorine; 3:1), during 20

minutes. Leaf discs (0.5 cm in diameter) were obtained and placed with the adaxial side in contact with the culture medium in petri dishes. Organogenesis was obtained when MS medium was supplemented with 0.5 or 1.0 mg/L BAP (6-benzylaminopurine), after four to eight weeks, callus proliferated from the edge of the discs. After induction, the callus was transferred to modified MS medium supplemented with 1.0 mg/L GA₃, under 16-hour photoperiod. Development of adventitious shoots was obtained from the callus tissue and the shoots were elongated and rooted in the same culture medium and acclimatized in the greenhouse.

5.3. INTRODUÇÃO

Passiflora suberosa é uma das espécies de maior variabilidade no gênero, apresentando variação intra-específica no conjunto cromossômico diplóide, a saber, $2n=12$, 24 e 36 cromossomos (Otoni et al., 1996). Interesse por esta espécie tem sido demonstrado por estudos realizados nas áreas de medicina farmacêutica, fitopatologia e cultura de tecidos. *P. suberosa* foi apontada como fonte de resistência ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (Otoni et al., 1996), além de apresentar resistência ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, causador da seca vascular (Gardner, 1989). Um glicosídeo cianogênico ciclopentenóide, denominado de passisuberosina, foi isolado de *P. suberosa*, (Spencer & Segler, 1987), segundo Conn (1981) este composto é um precursor do ácido cianídrico. Cromatografia e espectrometria de extratos de frutos de *P. suberosa* mostraram que estes são ricos em antocianinas, apresentando oito diferentes tipos (Kidoy et al., 1997). Pruthi et al. (1961) sugeriram que as antocianinas, obtidas da casca dos frutos do maracujá roxo (*Passiflora edulis*), podem ser utilizadas como corante natural.

Alguns autores relatam o cultivo *in vitro* de *P. suberosa*, utilizando explantes como folhas, segmentos nodais e internodais e gemas apicais (Drew, 1991; Scorza & Janick, 1980). Drew (1991), trabalhando com *P. suberosa*,

obteve plantas utilizando como explante gemas e segmentos nodais, cultivados em meio contendo 150 μ M de 2iP (isopenteniladenina) e 17,1 μ M de IAA (ácido indolacético). Florescimento *in vitro* foi obtido por Scorza & Janick (1980), utilizando internó de *P. suberosa* cultivados em 0,1 mg/L de BAP, sob condições de fotoperíodo. Isolamento de protoplastos a partir de mesófilo de *P. suberosa* foi obtido por Otoni et al. (1996). A influência da idade das plantas fornecedoras de explantes no isolamento dos protoplastos foi avaliada.

O estabelecimento de um sistema de regeneração *in vitro* de plantas de *P. suberosa* pode ser importante para aplicação em programas de melhoramento genético do gênero *Passiflora*, ou para propagação do maracujazeiro. Através do florescimento e frutificação *in vitro*, pode-se isolar dos frutos, corantes, como as antocianinas. Técnicas de hibridação somática podem ser utilizadas para obtenção de plantas resistentes a doenças com potencialidade para utilização como porta-enxerto. Este trabalho teve como objetivo a indução de gemas adventícias e posterior regeneração de plantas, a partir de discos de folha de *P. suberosa*.

5.4. MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas jovens de plantas de *Passiflora suberosa* germinadas e cultivadas em vasos, em casa de vegetação, foram coletadas para obtenção de explantes. A assepsia foi feita com solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), na proporção de 3:1, durante 20 minutos, seguida de 3 lavagens, com água esterilizada, em câmara asséptica.

Para indução de organogênese utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g/L de sacarose, 8,0 g/L de ágar e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), 0,0; 0,5; ou 1,0 mg/L. O pH foi ajustado a 5,8, o meio autoclavado e vertido em placas de petri (90 x 15 mm).

Discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados com a face adaxial em contato com o meio de cultura. Cada tratamento constou de 12 repetições,

cada uma sendo constituída de uma placa de petri contendo 10 explantes. O experimento foi instalado seguindo-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso. As culturas foram mantidas no escuro a 26 ± 2 °C, durante 4 semanas. Após esse período, com o auxílio de microscópio estereoscópico, os explantes foram avaliados quanto à formação de calo ou gemas adventícias.

Os calos e as bordas dos explantes foram transferidos para meio MSM (Monteiro et al., 1999b) acrescido de 1,0 mg/L de GA₃, mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 ± 1 °C, sendo subcultivados a cada 4 semanas.

As plântulas obtidas e enraizadas *in vitro* foram transferidas para copos descartáveis de 500 mL, contendo substrato irrigado (Plantmax) com solução nutritiva, cobertos com sacos plásticos transparentes, os quais foram abertos gradativamente.

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos explantes, após 4 semanas em meio de indução no escuro, mostrou que no tratamento testemunha (0,0 mg/L de BAP) não se observou formação de calo em nenhum dos discos (Fig. 6a), observando-se apenas leve oxidação nas bordas dos explantes. Nos tratamentos contendo BAP, observou-se formação de calo em 100% dos explantes. Esta formação ocorreu nas bordas dos discos de folha cultivados em meio contendo 0,5 ou 1,0 mg/L de BAP (Fig. 6b,c). Os calos apresentavam aspecto organogênico, com coloração amarelo-esverdeada e textura friável, sendo semelhante em coloração, textura e quantidade em ambos os tratamentos com BAP.

A formação de gemas foi observada a partir dos calos, após o cultivo em meio de cultura MSM acrescido de 1,0 mg/L de GA₃ (Cap. 3), sob condições de 16 horas de fotoperíodo. Inicialmente, observou-se a presença de pontos esverdeados nos calos, seguido do desenvolvimento de gemas, em ambos os tratamentos contendo BAP. As gemas regeneradas (Fig. 6d) foram isoladas dos

calos, transferidas para meio fresco (MSM + 1,0 mg/L GA₃), sendo subcultivadas a cada 28 dias. Apesar da formação de calo ter ocorrido em 100% dos explantes, a formação de gemas foi considerada baixa, com obtenção de apenas 4 plântulas, que foram posteriormente aclimatadas.

A resposta observada nos discos de folha de *P. suberosa* difere da organogênese observada em *P. edulis* f. *flavicarpa* a partir do mesmo explante e regulador vegetal. Nesta espécie, a formação das gemas ocorre direta ou indiretamente, sendo os calos de coloração esbranquiçada, de textura compacta (Monteiro et al., 1999a). As gemas são formadas durante as primeiras semanas, ainda em meio contendo BAP, no escuro. Em *P. suberosa*, as gemas não são observadas no meio de indução, sendo formadas posteriormente, em meio MSM contendo GA₃, sob condições de luz. Enraizamento foi observado após individualização e crescimento das gemas em meio de alongamento, não havendo necessidade do cultivo das plântulas em meio contendo auxinas, comumente utilizado para enraizamento *in vitro*. A formação de raízes em *P. edulis* f. *flavicarpa* também ocorre em meio MSM acrescido de 1,0 mg/L de GA₃ (Monteiro et al., 1999b). Drew (1991), trabalhando com diferentes espécies de *Passiflora*, inclusive *P. suberosa*, observou a formação de gemas adventícias e calos a partir de segmentos nodais. O enraizamento das plântulas ocorreu em meio MS contendo 5 µM de IAA (0,87 mg/L).

As plântulas obtidas, cerca de quatro meses após a indução (Figura 6e), foram aclimatadas em casa de vegetação (Figura 6f), sendo periodicamente irrigadas com solução nutritiva. Esta espécie apresentou maior facilidade e rusticidade durante as fases de alongamento e aclimação em relação às plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Figura 6: Organogênese a partir de discos foliares de *P. suberosa*. a) discos cultivados por quatro semanas em meio MS sem regulador vegetal, sem formação de calo; b-c) discos cultivados em meio contendo 0,5 mg/L (b) ou 1,0 mg/L (c) de BAP, apresentando proliferação de calos nas bordas, após quatro semanas; d) gema em fase inicial de desenvolvimento formada em meio de cultura contendo BAP, cultivada em meio MSM + 1,0 mg/L de GA₃, sob fotoperíodo; e) plântula enraizada *in vitro*, mostrando bom desenvolvimento de parte aérea e raízes; f) planta aclimatada em casa de vegetação.

5.6. CONCLUSÕES

O método utilizado para regeneração de plantas de *Passiflora suberosa* a partir de discos de folha mostrou-se eficiente. Os explantes respondem aos tratamentos contendo BAP (0,5 ou 1,0 mg/L), formando inicialmente calo e posteriormente gemas, desenvolvendo-se e enraizando em meio de cultura MSM contendo 1,0 mg/L de GA₃.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho constou da execução de pesquisas envolvendo o cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*, tendo sido apresentado em formato de três artigos científicos. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as espécies estudadas apresentaram comportamento variado *in vitro*.

Protocolos de regeneração de plantas a partir de organogênese em discos de folha foram eficientemente obtidos para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, utilizando-se tratamentos de indução com BAP (0,6; 0,8; 1,0 mg/L) ou TDZ (0,25; 0,50; 0,75 mg/L). Organogênese foi induzida em discos foliares de *P. alata* nas mesmas condições utilizadas para *P. edulis* f. *flavicarpa*, porém, regeneração de plantas não foi obtida. Discos foliares de *P. suberosa*, responderam aos tratamentos com BAP (0,5; 1,0 mg/L), formando gemas adventícias a partir das quais foi possível a regeneração de plantas.

Além de organogênese houve ocorrência de embriogênese somática a partir de discos de folha de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, principalmente nos tratamentos com TDZ. A conversão dos embriões em plantas, porém, não foi obtida. A resposta dos explantes aos tratamentos de indução variou conforme a época do ano, possivelmente por alterações no balanço hormonal endógeno nos explantes, obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação.

Plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* apresentaram sintomas de deficiência mineral *in vitro* e durante a fase de aclimação, em casa de vegetação. Com base na análise foliar de plantas de maracujá definiu-se um meio de cultura e solução nutritiva adequados para o cultivo de plântulas desta espécie (MSM).

Análise foliar de plântulas cultivadas em meio MS ou MSM comprovaram a eficiência do novo meio de cultura.

Através dos estudos realizados, foram estabelecidos protocolos de regeneração de plantas *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. suberosa* possibilitando a sua aplicação em trabalhos futuros de transformação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B. **Ethylene in plant biology**. New York: Academic Press, Inc., 1973. 302p.

AFZA, R.; VAN DUREN, M.; MORPURGO, R. Regeneration of *Ensete ventricosum* through somatic embryogenesis and adventitious buds. **Plant Cell Reports**, v.15, p.445-448, 1996.

ALVES, A.C. Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Piracicaba, 1999. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo.

AMUGUNE, N.O.; GOPALAN, H.N.B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, v.1, p.99-104, 1993. Resumo em **Tropag & Rural on CD-ROM**, 1975-06/97.

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

ARAI, M.; SAITO, T.; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana*

- tabacum*) internodes cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.523-528, 1997.
- BACCARIN, M.N.R.A. Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* spp. Piracicaba, 1988. 101p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.
- BARTOLO, W.C.F.; MACEY, J.K. Cobalt requirement in tissue culture of three species: *Brassica oleraceae* L., *Passiflora mollissima* Bailey, and *Saintpaulia ionantha* Wendl. **Journal of Horticultural Science**, v.64, p.643-647, 1989.
- BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v.11, p.173-187, 1992.
- BOULD, C.; HEWITT, E.J.; NEEDHAM, P. **Diagnosis of mineral disorders in plants**: principles. London: Her Majesty's Stationery Office, 1983. v.1. 170p.
- BURRITT, D.J.; LEUNG, D.W.M. Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia X Erythrophylla*: timing and specificity of the inductive stimuli. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.557-567, 1996.
- CALDAS, L.S.; GRATTAPAGLIA, D. Aplicações da biotecnologia na fruticultura: presente e futuro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, p.7-17, 1986.
- CEREDA, E.; FERREIRA, G. Sistemas de condução e manejo da cultura do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO

- MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá: do plantio à colheita.** Jaboticabal: Funep, 1998. p.93-103.
- CONN, E.E. Cyanogenic glycosides. **The Biochemistry of Plants**, v.7, p.479-500, 1981.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.
- CREEMERS-MOLENAAR, J.; HAKKERT, J.C.; VAN STAVEREN, M.J.; GILISSEN, J.W. Histology of the morphogenic response in thin cell layer explants from vegetative tobacco plants. **Annals of Botany**, v.73, p.547-555, 1994.
- CUENCA, B.; VIEITEZ, A.M. Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.326-332, 1999.
- DINIZ, J.D.N. Crescimento e absorção mineral em explantes de bananeira (*Musa* sp. AAB), cv. prata anã, *in vitro*. Piracicaba, 1996. 96p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v.15, p.106-110, 1995.
- 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.
- 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.
- FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p.93-97, 1996.
- 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, 1997a.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, p.1276-1277, 1997b.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2000**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 1999. p.398-406.

GABA, V.; SCHLARMAN, E.; ELMAN, C.; SAGEE, O.; WATAD, A.A.; GRAY, D.J. *In vitro* studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.1-7, 1999.

GARDNER, D.E. Pathogenecity of *Fusarium oxyporum* f. sp. *passiflorae* to Banana Poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, v.73, p.476-478, 1989.

GEIER, T.; SANGWAN, R. S. Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. **Plant Cell Reports**, v.15, p.386-390, 1996.

GOES, A. de; Doenças fúngicas da parte aérea da cultura de maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p.208-216.

GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S.; SILVA, J.R. da.; MACHADO, M.A. Cultura de tecidos de maracujá. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.61-77.

GROSSI, F. Adequação nutricional do meio de cultura para crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna* Smith *in vitro*, procedência Itatinga. Piracicaba, 1995. 125p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.

- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.105-119, 1993.
- HVOSLEF-EIDE, A.K. Mother plant temperature effects on growth of *in vitro* propagated daughter plants of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. **Scientia Horticulturae**, v.47, p.149-156, 1991.
- HVOSLEF-EIDE, A.K. Influence of environmental conditions on *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. mother plants and on the subsequent growth of *in vitro* explants. **Gartenbauwissenschaft**, v.58, p.89-94, 1993.
- KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, p.337-339, 1990.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.281-284, 1995.
- KIDOY, L.; NYGARD, A.M.; ANDERSON, O.M.; PEDERSEN, A.T.; AKSNES, D.W.; KIREMIRE, B.T. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora suberosa*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.10, p.49-54, 1997.
- KITAJIMA, E.W. Vírus e fitoplasmas do maracujazeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p.230-243.

- LIMA, A.A. **A pesquisa no Brasil com a cultura do maracujá.** Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1994. 14p. (Documentos, 55).
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá: do plantio à colheita.** Jaboticabal: Funep, 1998. p.217-229.
- MANDERS, G.; OTONI, W.C.; D'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.697-702, 1994.
- MANICA, I. **Fruticultura tropical: maracujá.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981. 160p.
- MOHAMED, F.M.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, p.668-672, 1992.
- MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.161-164, 1996.

- MONTEIRO, A.C.B. de A.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir de discos de folha. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 4., Piracicaba, 1996. **Resumos**. São Paulo: USP, 1996. v.1, p.417.
- MONTEIRO, A.C.B. de A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on leaf discs of *Passiflora* spp cultivated *in vitro*. In: CONGRESS ON IN VITRO BIOLOGY, New Orleans, 1999. **Addendum booklet**. New Orleans: Society For In Vitro Biology, 1999a. p.13.
- MONTEIRO, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Culture medium optimization of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESS ON IN VITRO BIOLOGY, New Orleans, 1999. **Addendum booklet**. New Orleans: Society For In Vitro Biology, 1999b. p.12.
- MORALES-ABANTO, A.; MÜLLER, L.E. Alteraciones producidas en el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) por deficiencias de manganeso, hierro, boro y zinc. **Turrialba**, v.27, p.163-168, 1977a.
- MORALES-ABANTO, A.; MÜLLER, L.E. Alteraciones producidas en el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) por deficiencias de magnesio, calcio y azufre. **Turrialba**, v.27, p.221-225, 1977b.
- 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, p.693-699, 1978.

- MORAN ROBLES, M. J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, v.29, p.224-228, 1979.
- MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: tranformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p.506-513, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURTHY, B.N.S.; SINGH, R.P.; SAXENA, P.K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv Ringo Rose) cotyledonary cultures. **Plant Cell Reports**, v.15, p.423-426, 1996a.
- MURTHY, B.N.S.; VICTOR, J.; SINGH, R.P.; FLETCHER, R.A.; SAXENA, P.K. *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. **Plant Growth Regulation**, v.19, p.233-240, 1996b.
- MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.268-276, 1995.

- OLIVEIRA, J.C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. **Maracujá** - cultura. Jaboticabal: FCAV, 1987. p.218-246.
- OLIVEIRA, J.C. de; NAKAMURA, K.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P. da C. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: São José, A.R. **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p.27-37.
- OTONI, W.C. Hibridação, embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Viçosa, 1995. 198p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
- OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECOM, 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, p.461-468, 1995a.
- OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECOM, P.R.; MARIA, J.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Influência do antibiótico cefotaxima na cultura de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres**, v.42, p.507-515, 1995b.
- OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v.43, p.157-164, 1996.
- PASSOS, I.R. da S. Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K. Piracicaba, 1999. 112p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- PEDROSO, M.C.; PAIS, M.S. Factors controlling somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, p.147-154, 1995.
- PRUTHI, J.S.; SUSHEELA, R.; LAL, G. Anthocyanin pigment in passion fruit rind. **Journal of Food Science**, v.26, p.385-388, 1961.
- REID, M.S. Ethylene in plant growth, development, and senescence. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.486-508.
- REUTER, D.J.; ROBINSON, J.B. (Ed.) **Plant analysis: an interpretation manual**. Collingwood: CSIRO, 1997. 2 ed. 572p.
- RINALDI, L.M.R. Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.25-28, 1999.
- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, p.71-83, 1998.
- ROSSI, A.D. Comercialização do maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p.279-287.
- RUGGIERO, C. Enxertia do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.43-91.

RUGGIERO, C; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI; 1996. 64p. (Publicações Técnicas FRUPEX; 19).

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Enxertia do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá**: do plantio à colheita. Jaboticabal: Funep, 1998. p.70-92.

SANTOS FILHO, H.P. Doenças do sistema radicular do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Maracujá**: do plantio à colheita. Jaboticabal: Funep, 1998. p.244-254.

SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; DUARTE FILHO, J.; LEITE, M.J.N. Formação de mudas de maracujazeiros. In: **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p.41-48.

SARAVITZ, C.H.; BLAZICH, F.A.; AMERSON, H.V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of fraser fir. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, p.163-167, 1993.

STATISTICAL ANALYSIS SISTEM. **SAS system for linear models**. Cary, NC: SAS Institute, 1986. 211p.

- SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p.892-897, 1980.
- SILVA, A.C. da; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, 1994. p.1-5.
- SOUSA, J.S.I. de; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. v.3, 179p.
- SPENCER, K.C.; SEGLER, D.S. Passisuberosin and epipassisuberosin: two cyclopentenoid cyanogenic glycosides from *P. suberosa*. **Phytochemistry**, v.26, p.1665-1667, 1987.
- SPOSITO, G.; MATTIGOD, S.V. **Geochem: a computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solutions and other material water systems**. Riverside: Kearney Foundation of Soil Science, University of California, 1980. 107p.
- TAYLOR, M.G.; VASIL, I.K. Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.10, p.120-125, 1991.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, K.I.; THORPE, T.A. (Ed.) **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.17-36.

- VAZ, R.L. A biotecnologia aplicada à fruticultura: necessidades e perspectivas potenciais. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.241-247.
- VESTRI, F.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. *In vitro* shoot regeneration in *Passiflora caerulea*. **Acta Horticulturae**, v.280, p.105-107, 1990.
- VICTOR, J.M.R.; MURCH, S.J.; KRISHNARAJ, S; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: the role of thidiazuron and N⁶-benzylaminopurine in induction of plant morphogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.28, p.9-15, 1999.
- ZHENG, Q.; DESSAI, A.P.; PRAKASH, C. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.15, p.381-385, 1996.