

Organogênese *In Vitro* em acessos de Maracujazeiro Amarelo infectados pelo vírus CABMV

In Vitro organogenesis in yellow passion fruit accessions infected by CABMV virus

Leonardo Monteiro Ribeiro*
José Ricardo Peixoto**
Solange Rocha Monteiro de Andrade***
Maria Olívia Mercadante Simões****
Rúbia Santos Fonseca*****
Lorena Melo Vieira*****

Resumo: O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a organogênese *in vitro* de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) infectadas com o vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Foram avaliados cinco acessos: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) e quatro fontes de explantes: ápice caulinar, segmento internodal, segmento nodal e fragmento foliar. Foi utilizado para indução o meio MS suplementado por 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (6-BAP). O segmento nodal apresentou melhor desempenho no cultivo enquanto os piores resultados foram obtidos o fragmento foliar. O acesso RG apresentou pior desempenho no cultivo do segmento internodal. Foram observadas em cortes histológicos meristemóides em explantes de nó e ápice.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; organogênese *in vitro*; 6-benzilaminopurina.

Abstract: The present work was performed with objective to determinate *in vitro* organogenesis from yellow passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) infected by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Five accessions were evaluated: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) and four sources of explants: cauline apex, internodal segment, nodal segment and foliar fragment. It was used for the induction the medium MS supplemented with 2 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine (6-BAP). The nodal segmented presented better cultivation performance and the worst results were obtained with the foliar fragment. The RG accession presented worse results in cultivation of internodal segment. Meristemoids were observed in histological cuts in nodal and cauline apex explants.

Key words: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; *in vitro* organogenesis, 6-benzylaminopurine.

* Professor do Departamento de Biologia Geral da Unimontes - e-mail: leomrib@hotmail.com

** Professor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB, e-mail: peixoto@unb.br

*** Pesquisadora da Embrapa-Cerrados – Planaltina – DF - e-mail: solange@cpac.embrapa.br

**** Professora do Departamento de Biologia Geral da Unimontes - e-mail: omercadante@hotmail.com

***** Acadêmicas do curso de Biologia da Unimontes - e-mails: rubiafonseca@hotmail.com, lorenamelovieira@hotmail.com

Introdução

O maracujazeiro amarelo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg, é uma das principais frutíferas brasileiras e a cadeia produtiva tem sido importante na criação de empregos nos meios rural e urbano e na geração de divisas por meio das exportações de suco (Pires & Mata, 2004). A cultura ocupou, no Brasil, a área de 34.778 ha, em 2002, havendo produção comercial em, praticamente, todos os estados (FNP, 2005).

Um dos principais problemas, enfrentados pelos passicultores, são as doenças de etiologia viral (Hanweg, 1999), especialmente a causada pelo vírus do endurecimento dos frutos, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Kitajima & Rezende, 2001; Bueno et al., 2004). Esta virose está disseminada por todo o país e causa sérias limitações à produtividade e à qualidade dos frutos (Kitajima & Rezende, 2001; Anjos et al., 2002).

A principal alternativa para a eliminação de vírus de plantas é a utilização de técnicas de cultura de tecidos, por meio do cultivo ou sub-cultivo *in vitro* de tecidos meristemáticos e não vascularizados, devido a menor distribuição do patógeno e sua dificuldade de multiplicação, nestas regiões (Torres et al., 1998; Ayabe & Sumi, 2001). A pequena dimensão e o desbalanço hormonal na região de cultivo, acarretam, normalmente, grande dificuldade de obtenção do explante e na regeneração das plantas, (Torres et al., 1998; Parmessur et al., 2002), sendo necessários estudos para viabilizar a utilização da técnica para cada espécie ou variedade (Torres et al., 1998).

Segundo Torres et al.(1998), entre os fatores que afetam a obtenção de plantas, a partir do cultivo *in vitro*, destacam-se a natureza genética do material e o órgão utilizado como fonte de material de cultivo. Foram encontradas diferenças significativas no desenvolvimento *in vitro* comparando-se várias espécies de *Passiflora* (Dornelas & Vieira, 1993; Drew, 1991). Não existem relatos de estudos que avaliem o efeito genético na organogênese dentro da espécie *P.*

edulis.

Diferentes tecidos têm sido usados como explantes, em espécies do gênero *Passiflora*: discos foliares (Vaz et al., 1993; Manders et al., 1994); segmentos nodais (Kantharajah & Dodd, 1990); gemas axilares (Faria & Segura, 1997); ápices caulinares (Junghans et al, 2002; Vidal et al., 2004); tecidos cotiledonares, tecidos foliares e tecidos hipocotiledonares (Dornelas & Vieira, 1994); segmentos radiculares, discos foliares e plântula inteira (Lombardi, 2003), e, entrenós e segmentos de gavinha (Grattapaglia & Machado, 1998). A sanidade da planta é, também, um fator determinante na capacidade de organogênese (Torres et al., 1998), bem como a ocorrência do patógeno e sua ação diferenciada nos diferentes órgãos da planta (Gioria et al. 2002), tornando-se importante a avaliação do potencial organogenético de diferentes fontes de explantes sob infecção.

Apesar de muitos trabalhos realizados, envolvendo a cultura de células e tecidos de maracujazeiro, ainda não existem protocolos desenvolvidos que viabilizem a sua utilização corrente (Junghans et al., 2004) sendo que, estudos sobre a eliminação de vírus são, ainda, incipientes (Hanweg, 1999; Junghans et al., 2004).

O objetivo do trabalho foi caracterizar, histologicamente, a organogênese *in vitro* de plantas infectadas pelo vírus CABMV e avaliar o efeito da utilização de diferentes órgãos e acessos como fonte de material de cultivo.

Metodologia

Mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) de cinco acessos, MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, e Rubi Gigante (RG), foram utilizadas como material de cultivo. Os acessos são representantes de populações utilizadas, comercialmente, no Triângulo Mineiro e Distrito Federal e foram estabelecidas em casa de vegetação na Estação Biológica da Universidade de Brasília, em Brasília-DF. As mudas, com sete meses de idade, foram inoculadas

com o vírus CABMV, avaliadas por sintomatologia com 100%, de incidência e nível de 2,6 de severidade (Tempesta Junior et al., 2002) e avaliadas como positivas pelo teste sorológico Elisa-direto. Foram retirados ramos apicais, com aproximadamente três segmentos nodais, que foram conduzidos ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília, onde foram submetidos ao processo de desinfestação, utilizando-se imersão em álcool 70% por 40 segundos, seguida de lavagem com água destilada e autoclavada, e, posterior imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos, e, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por cinco minutos cada (Vidal et al., 2004). Com auxílio de um bisturi, foram retirados dos ramos, diferentes tipos de explantes: ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento); segmento internodal adjacente ao ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento); segmento nodal adjacente ao ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento) e tecido foliar da menor folha apical que permitiu a obtenção de um quadrado de aproximadamente 3 mm de lado da lâmina foliar, excluindo-se a nervura central.

Os explantes foram transferidos, em câmara de fluxo laminar e condições assépticas, para frascos de vidro com capacidade de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura contendo sais MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de 3% de sacarose; 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (6-BAP); 10 mg.L⁻¹ de tiamina; 1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico (Ribas et al., 2002) e 2,7 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma), com pH ajustado para 5,8. Cada frasco, recebeu quatro explantes do mesmo tipo quanto ao órgão de origem e oriundos do mesmo acesso. O material foi encaminhado para incubação em câmara de crescimento sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz com nível de irradiância de 24 μmol m⁻². Após 21 dias de cultivo, os explantes viáveis foram transferidos, nas mesmas condições citadas, para outro meio de cultura, contendo sais MS adicionado de 2% de sacarose; 10 mg.L⁻¹ de tiamina; 1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 2,7 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma), com pH ajustado para 5,8. Foram realizadas as seguintes avaliações:

número de explantes vivos, explantes organogênicos e explantes com brotos aos 21 dias de cultivo; e estas mesmas avaliações, acrescentadas de número de brotos por explante aos 42 dias de cultivo. Foram considerados organogênicos os explantes que apresentassem formação de calo e ou tecidos meristemáticos e brotos o desenvolvimento das regiões meristemáticas que apresentassem expansão foliar.

O experimento foi conduzido no Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 5 x 4, totalizando 20 tratamentos, cada um representado por um acesso e uma origem do explante. Foram utilizadas 10 repetições e cada parcela foi constituída por um frasco com quatro explantes, totalizando 200 frascos e 800 explantes. Os dados coletados foram transformados em percentuais, com exceção do número de brotos por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância, e, quando constatada a significância pelo teste F, por meio do programa SAS (SAS Institute, 1990), o efeito dos tratamentos foi submetido ao teste Tukey, utilizando a transformação dos dados no modelo vx para as comparações.

Paralelamente, foi constituída uma repetição adicional de cada um dos tratamentos, sendo os explantes retirados do cultivo aos 15 e aos 30 dias para realização de cortes e análise histológica. As amostras foram fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940), durante 72 horas, e preservadas em álcool etílico 50%. Foram realizados cortes longitudinais em micrótomo manual. As secções foram coradas com safranina e azul de astra e confeccionadas lâminas semi-permanentes em glicerina 50 (Kraus & Arduim, 1997). Utilizando-se microscópio ótico, foram realizadas observações e descrição das estruturas anatômicas relacionadas à organogênese.

Resultados

Organogênese aos 21 dias de cultivo

Não foi observada contaminação microbiana no material de cultivo. A partir do terceiro dia, ocorreu progressivo intumescimento da maioria dos explantes de todos os

tratamentos, acompanhado pelo clareamento da coloração verde original. O intumescimento ocorreu, de forma predominante, em regiões distintas de acordo com a fonte do explante. Nos ápices caulinares, ocorreu principalmente nos primórdios foliares; no nó, concentrou-se na gema lateral; no caule, principalmente nas regiões de abscisão e nos segmentos foliares, em todo o explante. A partir de uma semana de cultivo, já era possível observar, a olho nu, em muitos explantes o desenvolvimento dos tecidos que sofreram o intumescimento inicial. A maioria dos explantes de ápice apresentou crescimento dos primórdios foliares seguido da expansão foliar e pequeno calejamento na região da excisão (Figura 1.a).

Nos explantes de nó foi observado o desenvolvimento da gema lateral concomitante a um intenso calejamento nas regiões apical e basal de abscisão (Figura 1.b), enquanto que, em explantes de caule houve formação de calos nas regiões apical e ou basal de excisão (Figura 1.c). Poucos explantes de folha desenvolveram calos visíveis a olho nu, apesar de a maioria ter apresentado intumescimento dos tecidos (Figura 1.d). A partir da primeira semana de cultivo, alguns explantes, em todos os tratamentos, apresentaram clorose que, na maioria dos casos, evoluiu para necrose progressiva dos tecidos os quais passaram a apresentar partes com coloração palha ou amarronzada, resultando em morte dos explantes.

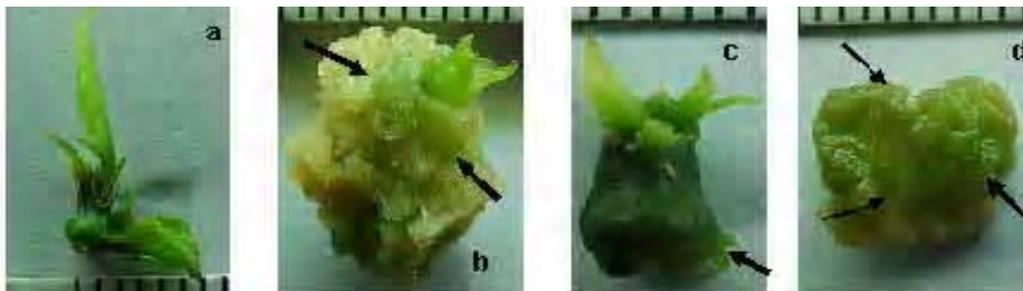


Figura 1 - Organogênese em explantes de maracujazeiro aons 30 dias de cultivo: a - Explante de ápice com expansão foliar e ausência de calejamento evidente; b - Explante de nó com brotação envovida por calejamento abundante (setas); c - Explante de caule apresentando brotação com expansão foliar e intumescimento da parte basal (seta); d - Explante de folha com regiões de calejamento (setas). Escala em 1mm.

Não houve interação entre os efeitos do acesso e da fonte de explante para o parâmetro sobrevivência dos explantes aos 21 dias. Não houve efeito significativo dos acessos. Foi observada diferença estatística para o efeito da fonte de explante. Explantes originados do nó e do ápice, apresentaram maior sobrevivência que explantes de folha. A média de sobrevivência dos explantes entre os acessos foi de 89,9% (Tabela 1).

Os acessos apresentaram média de 69,4% de explantes organogênicos e não diferiram estatisticamente.

As fontes provenientes do ápice e do nó apresentaram mesmo nível de explantes organogênicos, o caule nível intermediário e os explantes de folha, pior desempenho (Tabela 1).

Não foi constatada diferença significativa entre o efeito dos acessos na produção de brotos, com média de 40,5% de explantes com brotos em cada acesso. Na comparação entre as fontes de explantes, verificou-se que o ápice proporcionou maior percentual de explantes com brotos, enquanto os explantes originados de tecidos foliares não apresentaram brotação (Tabela 1).

Tabela 1

Percentual de explantes vivos, organogênicos e com brotos em função da fonte aos 21 dias de cultivo

Fonte	Explantes Vivos (%)	Explantes Organogênicos (%)	Explantes com Brotos (%)
Ápice	96,0 a	95,5 a	92,0 a
Nó	96,0 a	95,5 a	61,5 b
Caule	89,0 ab	83,5 b	9,0 c
Folha	78,5 b	3,0 c	0 d
Média	89,9	69,4	40,4
C.V.	17,3	17,9	28,1

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação

Organogênese aos 42 dias de cultivo

Não foi observada contaminação microbiana no material de cultivo durante esta fase. Houve interação entre os efeitos do acesso e da fonte de explante para o parâmetro explantes vivos aos 42 dias. Todos os acessos, com exceção de RG apresentaram o mesmo comportamento de MAR-2024 (Tabela 2) com

equivalência nos níveis de sobrevivência dos explantes originados de nó, ápice e caule, sendo que todos os explantes originados de folha não sobreviveram. O acesso RG, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre ápice e nó e apresentou diferença destes com caule, também sem sobrevivência dos explantes de folha (Tabela 3).

Tabela 2

Percentual de explantes vivos em função da fonte no acesso MAR-2024 aos 42 dias de cultivo

Fonte	Explantes vivos (%)
Nó	92,5 a
Ápice	82,5 a
Caule	82,5 a
Folha	0 b
Média	64,4
C.V.	14,9

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 3

Percentual de explantes vivos em função da fonte no acesso RG aos 42 dias de cultivo

Fonte	Explantes vivos (%)
Nó	90,2 a
Ápice	70,0 a
Caule	40,2 b
Folha	0 c
Média	50,1
C.V.	31,4

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

A avaliação dos percentuais de explantes organogênicos e de explantes com brotos foi realizada considerando os explantes sobreviventes. Houve interação entre o efeito dos acessos e das fontes de explante para o parâmetro explantes organogênicos. No genótipo

RG, foi observada diferença significativa entre as fontes de explante, com menor percentual de explantes organogênicos em explantes oriundos de caule (Tabela 4). Nos demais acessos não houve diferença significativa entre o efeito das fontes.

Tabela 4

Percentual de explantes organogênicos em função da fonte no acesso RG aos 42 dias de cultivo

Fonte	Explantes organogênicos (%)
Nó	92,5 a
Ápice	70,0 a
Caule	40,2 b
Média	67,6
C.V.	26,5

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

Não houve diferença significativa entre o efeito dos acessos no desenvolvimento de brotos com expansão foliar aos 42 dias. Na comparação entre as fontes de

explante, o ápice e o nó apresentaram efeito equivalente, e o caule proporcionou menor número de explantes com brotos (Tabela 5).

Tabela 5
Percentual de explantes com brotos em função da fonte aos 42 dias de cultivo

Fonte	Explantes com brotos (%)
Ápice	70,5 a
Nó	69,0 a
Caule	13,0 b
Média	50,9
C.V.	35,0

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

Para a avaliação do número de brotos por explante, foram considerados apenas as fontes nó e ápice, uma vez que poucos explantes de caule apresentaram brotações. Não houve diferença significativa entre os efeitos dos acessos, com médias de 1,25 brotos por explante entre os acessos. Os explantes originados do

nó apresentaram maior número de brotos por explante, com média de 1,54 brotos, em relação aos originados de ápice, com média de 1,0 (Tabela 6). Foi observado maior desenvolvimento dos explantes originados do nó em relação aos originados do ápice que apresentaram maior tendência à clorose e à vitrificação.

Tabela 6
Número médio de brotos por explante em função da fonte aos 42 dias de cultivo

Acesso	Brotos por explante
Nó	1,54 a
Ápice	1,0 b
Média	1,27
C.V.	18,1

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

A observação direta dos explantes mostrou a existência de grande quantidade de tecidos meristemáticos em forma de domo, ou meristemóides, anteriores ao estágio de gema, que ocorreram, concomitantemente, ao desenvolvimento das brotações e à expansão foliar tanto em explantes provenientes de nó (Figura 2.a) quanto nos provenientes de ápice (Figura 3.a). A

avaliação microscópica dos cortes histológicos mostrou que os meristemóides originaram-se na periferia dos explantes, e não apresentavam vascularização (Figuras 2.c, 3.b e 3.c). Nos explantes de ápice, foi evidenciada a organogênese direta com aparecimento dos meristemóides diretamente dos tecidos preexistentes. Nos explantes de caule, a organogênese ocorreu

indiretamente, com as regiões meristemáticas de nó ocorreu concomitantemente os dois processos. originadas a partir da formação de calo. Nos explantes



Figura 2 - Organogênese em explante de nó de maracujazeiro aos 30 dias de cultivo: a - desenvolvimento de brotação com expansão foliar e numerosos maristemóides de origem direta (seta da esquerda) e indireta (seta da direita); b - Detalhe dos maristemóides; c - corte anatômico de meristemóide evidenciando ausência de vascularização desenvolvida.

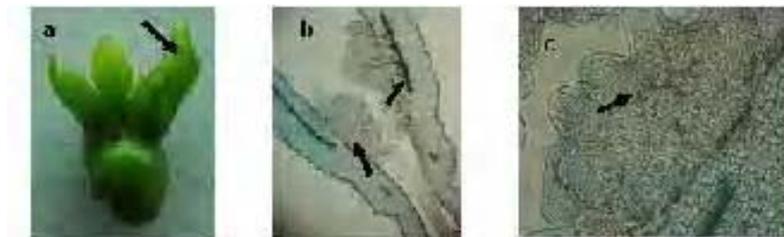


Figura 3 - Organogênese em explante de ápice de maracujazeiro aos 30 dias de cultivo: a - Explante com brotações apresentando expansão foliar e maristemóides no limbo (seta); b - Desenvolvimento de brotações em folhas jovens com formação do sistema vascular (setas); c - Detalhe de maristemóides, sem vascularização (na periferia) e do desenvolvimento inicial do sistema vascular (seta).

Discussão

A ausência de contaminação microbiana no cultivo sugere que é baixo o nível de contaminação inicial do material utilizado. O resultado demonstra, também, a eficiência do processo de desinfestação adotado, que foi utilizado com sucesso por Vidal et al. (2004) no cultivo de ápices caulinares e gemas laterais de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Normalmente, trabalhos com cultura de tecidos de espécies de *Passiflora*, realizados com material juvenil proveniente de plântulas obtidas por sementes germinadas *in vitro* ou plantas em casa de vegetação, não relatam a ocorrência de contaminação (Dornelas & Vieira, 1993; Dornelas et al., 1995; Faria & Segura, 1997; Biasi et al., 2000; Monteiro et al., 2000;

Ribas et al., 2002). Kantharajah & Dodd (1990) constataram média de 5% de contaminação em cultivo a partir de explantes de segmentos nodais de plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* de várias espécies de *Passiflora*. O mesmo nível de contaminação foi relatado por Biricolti & Chiari (1994) em trabalho com cultivo de ápices caulinares de *P. edulis* f. *edulis* retirados de plantas com um ano de idade, mantidas em casa de vegetação. Drew (1991), trabalhando com cultivo de gemas laterais de tecidos juvenis e adultos de várias espécies de *Passiflora*, destaca a ocorrência de contaminação endôgena no cultivo de material adulto proveniente de plantas de pomares comerciais.

A contaminação foi alta, chegando a 50%, em cultivo de explantes de gema lateral aderida ao segmento caulinar comparada a 5% quando a gema foi cultivada isoladamente. Neste caso, o tratamento com hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 15 minutos não se mostrou efetivo.

O efeito do acesso na organogênese, observado na interação com a fonte de explante aos 42 dias, é compatível com a grande variabilidade genética do maracujazeiro (Cunha et al., 2004). Apesar de não ter havido influência na produção de brotos, é possível que haja influência genética no seu desenvolvimento. Tal efeito tem sido observado em comparações inter-específicas no gênero *Passiflora* (Drew, 1991; Dornelas & Vieira, 1993), e, sugere a necessidade de estudos envolvendo a utilização da diversidade genotípica em experimentos sobre o comportamento *in vitro*.

O insucesso no cultivo de explantes originados de folhas pode ser atribuído a fatores como o baixo potencial de organogênese do órgão, idade da planta, baixa sanidade e inadequação do meio. Becerra et al. (2004), trabalhando com cultivo de discos foliares de *P. edulis f. flavicarpa*, constataram que explantes de plantas com 2 meses de idade proporcionaram melhores níveis de regeneração em relação à plantas adultas. As mudas utilizadas no experimento possuíam 7 meses de idade e o efeito adverso da idade pode ter se expressado de maneira mais intensa no tecido foliar, mais diferenciado.

A sanidade do material de cultivo, também, é outro fator determinante para o sucesso da regeneração (Torres et al., 1998). A presença do vírus e os efeitos da infecção podem ocorrer de forma diferencial entre os órgãos da planta, conforme relatam Gioria et al. (2002), em trabalho com CMV em *P. edulis f. flavicarpa*. Neste caso, pode ter havido efeito prejudicial à organogênese, causado pela infecção viral na folha de forma mais intensa que nos outros órgãos.

A concentração do fitoregulador 6-BAP, também, pode ter contribuído para o insucesso do cultivo dos explantes foliares.

Monteiro et al. (2000) trabalhando com explantes foliares de plantas jovens de *Passiflora suberosa*, obtiveram 100% de calejamento em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ ou 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, embora a formação de gemas e a regeneração tenham sido pequenas. Lombardi (2003) em *P. cincinnata*, utilizando 0,5 a 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP e Dornelas & Vieira (1994) em *P. edulis f. flavicarpa* utilizando 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, também, obtiveram explantes organogênicos a partir de tecidos foliares jovens.

A concentração e o tempo de exposição ao 6-BAP utilizados mostram-se eficientes para a indução da organogênese nos explantes originados do ápice caulinar e do segmento nodal. Esses parâmetros podem ter influenciado, diferencialmente, os tecidos cultivados, uma vez que, os explantes de ápice apresentaram maior nível de indução, com maior percentual de explantes organogênicos aos 21 dias, enquanto que, aos 42 dias, explantes de ápice e nó apresentaram mesmo nível de indução. Segundo Kerbauy (1998), a competência para absorção e reação aos estímulos na organogênese varia de acordo com a condição morfo-fisiológica dos tecidos sendo necessários indutores específicos. Estudos sobre as condições de cultivo, incluindo variações no meio de cultura, poderão contribuir para o incremento dos resultados na organogênese dos diferentes tecidos utilizados neste trabalho.

A formação de tecidos meristemáticos sem desenvolvimento de gemas, chamados meristemóides (Fernando, 2005), em diferentes estádios de desenvolvimento, concomitante às brotações principais, foi também relatada por Kantharajah & Dodd (1990); Dornelas et al. (1995) e Ribas et al. (2002) em cultivo de espécies do gênero *Passiflora*. Fernando (2005) demonstrou que explantes hipocotiledonares de *P. edulis f. flavicarpa* apresentaram, simultaneamente, meristemóides oriundos de organogênese direta e indireta, enquanto que explantes foliares apresentaram apenas organogênese direta. Neste trabalho, observou-se que a maior produção de brotações, oriundos do segmento nodal, foi favorecida pela capacidade organogenética direta e indireta.

A formação de grande número de meristemóides sem o sistema vascular ligado à vascularização do explante pode ser importante na utilização da técnica de subcultivo de brotações visando a eliminação de vírus proposta por Ayabe & Sumi (2001) como uma alternativa à cultura de meristemas apicais adultos que tem se apresentado inviável para o maracujazeiro (Biricolti & Chiari, 1994). Segundo Ayabe & Sumi (2001), o cultivo de regiões meristemáticas obtidas da organogênese indireta em segmentos foliares de alho (*Allium sativum* L.) resultaram em plantas livres de vírus. São necessários, no entanto, estudos para a verificação do efeito residual do 6-BAP no desenvolvimento dos tecidos meristemáticos, uma vez que Biasi et al. (2000) em *P. edulis* f. *flavicarpa* e Dornelas & Vieira (1994) em *Passiflora* spp. relatam efeito favorável na indução, mas prejudicial na alongação das brotações da dosagem de 2 mg.L⁻¹ de BAP.

Conclusões

Os acessos apresentaram comportamento semelhante até os 21 dias de cultivo. Aos 42 dias de cultivo os acessos, com exceção de RG, apresentaram equivalência no desempenho das fontes caule, ápice e nó, sendo que todos os explantes originados de folha não sobreviveram. O acesso RG apresentou menor nível de sobrevivência e de explantes organogênicos em explantes de caule em relação a ápice e nó, também, não havendo sobrevivência de explantes de folha.

O segmento nodal proporcionou maior número de brotações por explante, e, organogênese pelas vias direta e indireta. Explantes apicais apresentaram organogênese direta enquanto explantes caulinares apresentaram organogênese indireta.

O meio de cultivo utilizado, com suplementação hormonal de 2mg.L⁻¹ de 6-BAP, foi eficiente na indução da organogênese nos explantes originados de ápice e nó.

Houve formação de grande número de meristemóides nos explantes de ápice e nó.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento. Ao professor Augusto Franco, coordenador do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UnB, pelo uso das instalações e equipamentos.

Referências Bibliográficas

- ANJOS, J.R. dos; JUNQUEIRA, N.T.; CHARCHAR, M.J. A. Levantamento do passion fruit woodiness vírus em maracujazeiro-azedo no cerrado do Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. Belém. *Anais...* Belém: CBF, cd-rom, 2002.
- AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing vírus-free garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Report*, Berlin, v. 20, p. 503-507, 2001.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BIASI, L.A. et al. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.
- BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. *Advances in Horticultural Science*, Viale delle Idee, v.8, n. 3, 171-175, 1995.
- BUENO, P.A. de O.; et al. Incidência e severidade de passionfruit woodiness vírus (PWV) em 50 genótipos de maracujazeiro azedo, sob condições de campo do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. *Anais...* Fortaleza: CBFcd-rom, 2004.
- CUNHA, M.A.P. da; BARBOSA, L.V.; FARIA, G.A. Melhoramento Genético. In: LIMA, A de A.; CUNHA,

- M.A.P. da. *Maracujá: Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura*, p.69-93, 2004.
- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVIERA, J.C. de; VIEIRA, M.L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 15, p. 106-110, 1995.
- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVIERA, J.C. de; 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*, Berlin, 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*. Netherlands, v. 36, p. 211-217, 1994.
- DREW, R. A. In vitro culture of adult and juvenile bud explant of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 26, p. 23-27, 1991.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. *Hortscience*, Alexandria, v. 32, p. 1276-1277, 1997.
- FERNANDO, J. A. *Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro de Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.* 2005. 106 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. FNP. Agriannual - anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, p. 394-395, 2005.
- GIORIA, R.; ESPINHA, L.M.; REZENDE, J.A.M.; GASPAR, J.O.; KITAJIMA, E.W. Limited movement of Cucumber mosaic virus (CMV) in yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, p. 127-133, 2002.
- GRATTAPAGLIA D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 183-260, 1998.
- HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. *Neltropica Bulletin*, Nelspruit, n. 304, p. 7-8, 1999.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. Mac Graw Book Company Inc., New York, 1940. 523 p.
- JUNGHANS, T.G.; VIDAL, A.M.; SOUZA, A da S. Cultivo in vitro de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. Belém, 2002. *Anais...* Belém: CBF, 2002, cd-rom.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S.; KOBAYASHI, A.K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. *Maracujá: Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura*, p. 97-106. 2004.
- KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). *Annals of Botany*, Oxford, v. 65, p. 337-339. 1990.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 183-260, 1998.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A. M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: *Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001, p. 85-137.
- KRAUS, J.E. & ARDUIM, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Ed. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 1997, 198 p.
- LOMBARDI, S.P. *Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em Passiflora cincinnata MAST*. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 60 p. , 2003.
- MANDERS, G. et al. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 13. p. 697-702, 1994.

- MONTEIRO, A.C.B. de A.; et al. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, p. 571-573. 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Lund, v. 15, p. 473-497. 1962.
- PARMESSUR, Y.; et al. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, p. 561-566. 2002.
- PIRES, M. de M.; MATA, H.T. da C. Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujáno Brasil. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M.A.P. da. *Maracujá: Produção e qualidade na passicultura*. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, p. 325-343. 2004.
- RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 32, p. 237-241. 2002.
- SAS INSTITUTE. *SAS User's guide: statistics version*. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1990. 846 p.
- TEMPESTA JUNIOR, R.; et al. Desenvolvimento vegetativo e severidade do vírus do endurecimento do fruto (passionfruit woodiness vírus - PWV) em 17 genótipos de maracujazeiro azedo, cultivados no Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, *Anais...* Fortaleza: CBF, 2004, cd-rom, 2004.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 133-145. 1998.
- VAZ, F.B. d'U.; et al. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 12, p. 220-225, 1993.
- VIDAL, A. M.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. Estabelecimento in vitro de maracujazeiro amarelo, acesso BGM 39. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. *Anais...* Fortaleza: CBF, cd-rom, 2004.