

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JULIANA APARECIDA FERNANDO

ESTUDOS ANATÔMICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal.**

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F391e

Fernando Juliana Aparecida
Estudos anatômicos e ultra-estruturais da
organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f.
flavicarpa Deg. / Juliana Aparecida Fernando. --
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Beatriz Appezzato-da-Glória.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Amitose. 2. Histologia. 3. Morfogênese. 4.
Maracujá. I. Beatriz Appezzato-da-Glória. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Anatomy and ultrastructural studies of *in vitro* organogenesis of *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.

Palavras-chave em inglês: amitosis, histology, morphogenesis, passionfruit.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Beatriz Appezzato-da-Glória, Maria Lúcia Carneiro Vieira, Wagner Campos Otoni, Angelo Luiz Cortelazzo, Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Data da defesa: 17/06/2005.

Data da defesa: Campinas, 17 de junho de 2005.

Banca examinadora:

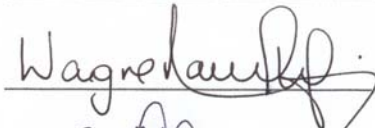
Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória



Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

Maria Lucia Carneiro Vieira

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni



Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro



Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaf Shepherd



Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado



**Ofereço a Deus,
na certeza de que Ele sempre
iluminou o meu caminho.**

**Dedico este trabalho aos meus pais,
João (*in memoriam*) e Diomar, com
muito amor.**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, por ter possibilitado a realização do presente trabalho.

Ao Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), por ter disponibilizado suas dependências para a realização deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto “Estudos histológicos e ultra-estruturais da diferenciação de meristemóides na organogênese *in vitro*” (Processo 01/10986-3), pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, pela orientação, contribuição na minha formação acadêmica e por todos esses anos de amizade.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), por ter disponibilizado as dependências do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas.

À Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Botucatu), pelo auxílio nas análises ao microscópio eletrônico de transmissão e interpretação das elétrôn-micrografias.

À Profa. Dra. Elisa A. Gregório do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, por ter disponibilizado as dependências do laboratório para a realização deste trabalho e pelas valiosas discussões.

À Profa. Dra. Clarice G. B. Demétrio e à aluna de doutorado Elizabeth Strapasson do Departamento de Ciências Exatas (ESALQ/USP), pelas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) (ESALQ/USP), por ter possibilitado o processamento do material para microscopia eletrônica de varredura e disponibilizado o laboratório para as práticas de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos Professores Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, Dra. Silvia Rodrigues Machado e Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, pelas sugestões e críticas da pré-banca.

À auxiliar acadêmica Maria Helena Moreno do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, pelos ensinamentos e auxílios prestados nos procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi, pela leitura e sugestões dadas durante a realização deste trabalho e pela nossa grande amizade. Muito obrigada.

À farmacêutica Sra. Marli Kasue Misaki Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), pelo acompanhamento nas técnicas ultra-estruturais e pela amizade.

Ao biólogo Carlos Alberto de Oliveira, técnico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética (ESALQ/USP), pelos auxílios prestados, amizade e bom humor.

À Dra. Mariza Monteiro, pelas informações, auxílios prestados e por ser uma grande amiga.

Aos professores do Departamento de Botânica da UNICAMP, pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Biologia Vegetal (UNICAMP), pelos auxílios prestados.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas (ESALQ/USP), pela convivência e amizade.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), por todos esses anos de convivência e amizade.

Ao Vagner, pelo companheirismo e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Gisele e João Mateus, à minha avó Maria e ao meu cunhado Adriano, pelo incentivo.

Aos amigos Aline Redondo Martins, Divina Villhalva, Graziela Cury, João Paulo Rodrigues Marques, Lucimara Rogéria Antonioli, Simone Pacheco Lombardi, Silvia Blumer, Renata Takassugui Gomes, Roseli Rocha, Lindolpho Capellari Júnior, Telma Hayashi, Bruna Degaspari e Viviane Cristina de Oliveira pelos auxílios prestados, convivência e momentos de descontração.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, principalmente Ana Paula, Gláucia Morelli, Raquel Antunes e Shesterson Aguiar.

Às grandes amigas Aldirene Costa Franco Rosas, Ana Lúcia Catto, Rosane Moreira de Meirelles e Seila A. Zangirolamo Ferezini, por terem me apoiado e estarem ao meu lado em todos os momentos, independente do tempo e da distância.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Organogênese <i>in vitro</i> no gênero <i>Passiflora</i>	4
2.2 Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese <i>in vitro</i>	7
2.3 Água de coco e o cultivo <i>in vitro</i>	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Indução da organogênese <i>in vitro</i> em <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. população FB - 100.....	14
3.1.1 Obtenção de material vegetal.....	14
3.1.2 Organogênese <i>in vitro</i>	14
3.1.3 Efeito da água de coco na organogênese <i>in vitro</i>	15
3.2 Análises histológicas.....	15
3.3 Análises ultra-estruturais.....	16
3.3.1 Análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	16
3.3.2 Análise ao microscópio eletrônico de transmissão (MET).....	16
3.4 Análises estatísticas.....	17
3.4.1 Ensaio 1.....	17
3.4.2 Ensaio 2.....	18
3.4.3 Ensaio 3.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Aspectos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. população FB - 100.....	19
4.2 Influência do explante e da água de coco na organogênese <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. população FB - 100.....	29
5 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ILUSTRAÇÕES.....	49
APÊNDICES.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA: Ácido 3-indolacético

AIB: Ácido 3-Indolbutírico

ANA: Ácido Naftalenoacético

BA: 6-Benzilaminopurina

GA₃: Ácido giberélico

I: Iodo

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MS: Murashige e Skoog

NaOCl: Hipoclorito de sódio

OsO₄: Tetróxido de ósmio

TDZ: Tidiazuron

ZIO: Solução de Iodeto de Zinco e Tetróxido de ósmio utilizada para reconhecer sistemas de membranas.

Zn: Zinco

RESUMO

As células dos meristemóides são responsáveis pela expressão da via organogênica *in vitro*. Esses meristemóides podem ser formados no explante ou no calo originado do explante, caracterizando a organogênese direta e indireta, respectivamente. Tendo em vista que a organogênese *in vitro* é um pré-requisito ao desenvolvimento de estratégias de micropropagação e à transformação genética de plantas, o monitoramento histológico e ultra-estrutural das células envolvidas nesse processo de regeneração fornece subsídios para a otimização desses protocolos. Nesse contexto, a população FB – 100 de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. foi avaliada quanto ao processo de diferenciação dos meristemóides, à fonte de explante e à adição de água de coco ao meio de cultura. Para análises dos meristemóides, explantes foliares e hipocotiledonares foram inoculados em meio de cultura MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco. Os estudos anatômicos dos explantes hipocotiledonares mostraram que os meristemóides eram formados a partir da camada epidérmica e das subepidérmicas. Os meristemóides originaram primórdios foliares e, esporadicamente, gemas. Em geral, os meristemóides continuavam o processo de divisão originando protuberâncias. Essas protuberâncias eram constituídas pela camada epidérmica e pelas subepidérmicas meristemáticas e células centrais parenquimáticas, sendo que somente as células periféricas eram capazes de originar gemas. Nos explantes foliares, o processo era similar ao descrito para os explantes hipocotiledonares. Porém, a camada epidérmica e as subepidérmicas das protuberâncias não eram definidas e o número de gemas formadas foi significativamente inferior ao obtido utilizando-se os explantes hipocotiledonares. Portanto, as análises estruturais e as análises estatísticas confirmaram a superioridade do explante hipocotiledonar em relação ao foliar. Os explantes hipocotiledonares desenvolveram um pequeno calo na superfície seccionada do explante. As camadas periféricas desse calo formaram meristemóides que originaram primórdios foliares, gemas esporádicas ou continuaram a se dividir formando protuberâncias. No presente trabalho foi caracterizada a ultra-estrutura das células das protuberâncias formadas diretamente nos explantes hipocotiledonares e aquelas originadas no calo. Os estudos mostraram que nas células meristemáticas das protuberâncias diretas o núcleo apresentou formato circular. Por sua

vez, nas protuberâncias formadas no calo, o envoltório nuclear exibia grande quantidade de poros, profundas invaginações e fragmentação nuclear, caracterizando o processo amitótico. As análises ao microscópio eletrônico de varredura dos explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA suplementado ou não com 5% de água de coco mostraram que as gemas e as protuberâncias obtidas em ambas condições de cultivo apresentaram as mesmas características estruturais.

SUMMARY

Meristemoids are responsible for the *in vitro* organogenesis expression. They may be formed from the explant (direct organogenesis) or from callus (indirect organogenesis). Once *in vitro* organogenesis is a prerequisite for developing micropropagation strategies and genetic transformation in plants, the ultrastructural analysis of the cells involved in such regeneration provides basic information that optimize protocols. In this context, FB - 100 population of *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. was evaluated as to the meristemoids differentiation, the source of explant and the coconut water supply to the culture medium. Meristemoids were analysed from leaf and hypocotyledonar explants cultured in MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BA and 5% coconut water. The histological analyses of the hypocotyledonar explants showed that meristemoids arose from epidermal and subepidermal layers. Meristemoids originated leaf primordia and, sometimes, buds. In general, meristemoids continued dividing, forming protuberances. Such protuberances consisted of meristematic epidermal and subepidermal cells, as well as central parenchymatic cells, although only peripheral layers of the protuberances originated buds. In leaf explants, this process was similar to the processes described for hypocotyledonar explants. However, epidermal and subepidermal layers of protuberances on leaf explants were not well-defined and the number of buds originated from leaf explants was significantly smaller than the number of buds from hypocotyledonar explants. Structural and statistical evaluations confirmed that the hypocotyledonar explants were better than leaf explants. Hypocotyledonar explants developed a callus in the cut region surface. Peripheral layers of the callus formed meristemoids that gave rise to leaf primordial and buds, or continued dividing to form protuberances. This work characterized the ultrastructure of protuberance cells originated directly on the hypocotyledonar explants, as well as those originated on callus. Meristematic cells of direct protuberances showed spherical nucleus. On the other hand, in indirectly-formed protuberances the nuclear envelope showed a large number of nuclear pore complexes, deep invaginations and nuclear fragmentation characterizing the amitotic process. Analyses under scanning electron microscope of the hypocotyledonar explants cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BA and either with or without 5% coconut water did not

evidence structural differences between buds and protuberances. The quantitative evaluation demonstrated that coconut water was efficient to increase the number of buds.

1 INTRODUÇÃO

As células vegetais apresentam a propriedade da totipotência. Isto significa que as células são autônomas e têm potencial para regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (Kerbaudy, 1999). Todavia, diferentes expressões morfogênicas decorrem da integração dos processos de divisão e diferenciação celular (Guerra et al., 1999). Células vegetais diferenciadas podem se desdiferenciar, induzindo à formação de embriões somáticos (embriogênese somática), ou à formação de gemas ou raízes adventícias (organogênese) (Sugiyama, 2000). Enquanto os embriões somáticos são estruturas bipolares não conectadas ao tecido de origem por meio de vascularização, as gemas são monopolares e desenvolvem ampla conexão vascular com o tecido de origem (Haccius, 1978).

Geralmente, para a micropropagação e a transformação genética de plantas são necessárias pesquisas relacionadas à morfogênese *in vitro* procurando estabelecer e otimizar protocolos. Contudo, é necessário monitorar e determinar, por meio de análises histológicas, tanto a via morfogênica quanto os tipos celulares a partir dos quais se originam os embriões somáticos ou as gemas caulinares (Matsumoto et al., 1996), visto que, numa mesma condição de cultivo *in vitro*, é possível obter plantas regeneradas via embriogênese somática e organogênese (Falco et al., 1996). Ou ainda, uma mesma espécie pode apresentar as duas vias de regeneração ao se modificar somente o fitorregulador adicionado ao meio de cultura (Dornelas et al., 1992; Mithila et al., 2003). Pesquisas revelam que a presença de células meristemáticas localizadas internamente à superfície do explante pode ser uma das causas da baixa eficiência do processo de transformação genética (Mukhopadhyay et al., 1992). Desse modo, esses trabalhos enfatizam a necessidade de acompanhamento estrutural do cultivo *in vitro* de células e tecidos.

A regeneração *in vitro* via organogênese é um processo que envolve a formação de centros meristemáticos ou meristemóides (Ramage e Williams, 2002). Algumas células do explante podem ser convertidas diretamente em um meristemóide (organogênese direta) ou podem apresentar uma intervenção de calo antes de sua formação (organogênese indireta) (Hicks, 1994). Essas populações de células podem reagir a

indutores exógenos, geralmente auxinas e citocininas ou ambos, estabelecendo um caminho particular de desenvolvimento para a formação de meristemas apicais caulinares, radiculares ou florais (Hicks, 1994).

Para algumas espécies, além dos fitorreguladores, a adição de outros componentes ao meio de cultura pode maximizar o processo organogênico *in vitro*. Assim, o uso de água de coco, por exemplo, estimula o potencial de regeneração dos tecidos em certas espécies, como observado por Kantharajah e Dodd (1990), Dornelas e Vieira (1994) e Hall et al. (2000). Contudo, a utilização dessa mistura complexa pode influenciar a resposta organogênica *in vitro*, sendo necessárias análises estruturais das formações obtidas.

Cabe considerar que os eventos responsáveis pela diferenciação celular estão diretamente relacionados com o ambiente celular interno. Recentemente, Appezzato-da-Glória e Machado (2004) realizaram análises ultra-estruturais dos meristemóides de *Bauhinia forficata* Link (organogênese indireta) e *Glycine max* (L.) Merrill (organogênese direta). As autoras evidenciaram que apenas as células dos meristemóides da via indireta apresentaram fragmentos de cromatina interfásica no citoplasma, indicando a ocorrência de amitose. As divisões celulares amitóticas ocorrem, aparentemente, na transição de um estado celular diferenciado para um estado de crescimento desorganizado (Bregoli et al., 1997). De fato, nos poucos registros disponíveis na literatura, o processo amitótico na cultura de tecidos foi sempre associado à fase de calos (Cionini et al., 1978; Bayliss, 1980; Fasseas e Bowes, 1980; Natali e Cavallini, 1987; Wang et al., 1998; Appezzato-da-Glória e Machado, 2004), sendo que a fragmentação do núcleo nas células do calo pode induzir à variação cromossômica (Bayliss, 1980). Caso essa variação cromossômica gere variabilidade de natureza genética (variação somaclonal), a via organogênica direta seria a mais indicada para obtenção de plantas transgênicas (Appezzato-da-Glória e Machado, 2004). Entretanto, condições de cultura apropriadas podem permitir o retorno da cultura a um estado homogêneo, produzindo plantas geneticamente estáveis (Tylicki et al., 2002). Assim, é essencial compreender as alterações ultra-estruturais que ocorrem nos meristemóides formados nas vias direta e indireta durante o processo organogênico *in vitro*.

Diante do exposto, o presente trabalho procurou comparar o processo de diferenciação dos meristemóides na organogênese direta e indireta de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., o maracujá amarelo. Esta espécie produz frutos de interesse comercial para a produção de suco e consumo *in natura* (Appezzato-da-Glória et al.,

1999). Dados do FNP (2004) mostram que a produção brasileira de maracujá foi de 467.464 toneladas no ano de 2001, sendo o Estado da Bahia o principal produtor com cerca de 97.747 toneladas, seguido pelo Estado de São Paulo com 70.835 toneladas produzidas. A referida espécie vem sendo estudada há mais de 10 anos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba, com o objetivo de estabelecer protocolos de regeneração de plantas *in vitro* visando, entre outros aspectos, a transformação genética da espécie, já que sua susceptibilidade a doenças causadas por vírus e bactérias tem limitado a expansão da cultura (Vieira e Carneiro, 2004).

Considerando-se que o desenvolvimento de pesquisas com perspectiva anatômica e ultra-estrutural auxilia a compreensão do processo organogênico *in vitro*, o presente estudo foi conduzido com a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. população FB - 100, com os seguintes objetivos:

- monitorar, por meio de análises histológicas e ultra-estruturais, a diferenciação dos meristemóides a partir de explantes foliares e hipocotiledonares;
- comparar a resposta organogênica *in vitro* dos explantes foliares e hipocotiledonares;
- verificar, sob o ponto de vista estrutural e quantitativo, se a adição de água de coco ao meio de cultura exerce influência na organogênese *in vitro* a partir de explantes hipocotiledonares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Organogênese *in vitro* no gênero *Passiflora*

A organogênese *in vitro* é caracterizada pela formação de uma estrutura unipolar que estabelece conexão com o tecido de origem (Brown e Thorpe, 1986). Esse processo de regeneração *in vitro* pode ocorrer diretamente no tecido do explante, caracterizando a via direta, ou pode ocorrer uma fase de calo antes da formação do órgão, sendo denominada organogênese indireta (Hicks, 1980). Trata-se de um sistema experimental adequado para a distinção de padrões de divisão e expansão celular, possibilitando comparar a determinação caulogênica direta e indireta (Ovecka et al., 2000).

De maneira geral, a cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora* compreende a preservação de recursos genéticos e a obtenção de plantas transgênicas (Vieira e Carneiro, 2004); ressalte-se que o potencial propagativo em questão depende da espécie e da fonte de explante (Apezzato-da-Glória et al., 1999). Para o gênero *Passiflora*, a literatura já relatou tanto a via organogênica direta (Kantharajah e Dodd, 1990; Dornelas e Vieira, 1994; Apezzato-da-Glória et al., 1999; Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004) quanto a via indireta (Monteiro et al., 2000; Lombardi et al., 2003) de regeneração *in vitro*.

É importante considerar que, para o desenvolvimento de órgãos *in vitro* fatores como genótipo, tipo de explante e composição do meio de cultura (Brown e Thorpe, 1986; Thorpe, 1994) são relevantes para o sucesso dessa via de regeneração.

Dornelas e Vieira (1994) mostraram que a produção de gemas via organogênese direta variou entre as espécies e entre as fontes de explante. Nessa pesquisa foram estudados explantes cotiledonares, hipocotiledonares e foliares das espécies selvagens *P. amethystina*, *P. giberti*, *P. mollissima* e *P. maliformis* e se constatou a ocorrência de gemas em todas as espécies a partir dos explantes avaliados. Os autores ainda enfatizaram que para *P. edulis* f. *flavicarpa*, espécie economicamente importante, o tipo de explante também influenciou a resposta *in vitro*, relatando uma média de 57,3, 46,0 e 18,2 gemas por explante cotiledonar, foliar e hipocotiledonar, respectivamente.

Além da espécie e fonte de explante, os fitorreguladores também exercem influência sobre a resposta organogênica *in vitro* no gênero em questão. A utilização

dessas substâncias reguladoras do crescimento é fundamental para o estabelecimento da competência e determinação celular, condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Kerbaudy, 1999). Segundo Appezzato-da-Glória et al. (1999), os explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* apresentaram respostas morfogênicas distintas quando cultivados em meio MS contendo BA ou ANA. Os autores verificaram que a adição de 1,0 mg L⁻¹ de BA ao meio de cultura originou gemas diretamente no tecido do explante, enquanto a rizogênese ocorreu na presença de 1,0 mg L⁻¹ de ANA.

Robles (1979) verificou o potencial morfogênico dos entrenós de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molissima* utilizando o meio de Nitsch contendo 2,0 mg L⁻¹ de cinetina. O autor observou a formação de calo para ambas espécies e, posteriormente, a regeneração de plantas, ressaltando que o potencial morfogênico das espécies avaliadas seria útil para a multiplicação vegetativa e manutenção das características genéticas da planta de origem. Por outro lado, Kantharajah e Dodd (1990), utilizando segmentos nodais de *P. edulis* 'Norfolk Island' cultivados em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BA e 20% de água de coco, verificaram a formação de gemas caulinares sem a produção de calo, caracterizando a via organogênica direta. Esses autores também verificaram que os explantes foliares cultivados em meio acrescido de 1,5 mg L⁻¹ de BA e 0,5 mg L⁻¹ de ANA formaram somente calo, ressaltando que tais explantes pareceram apresentar pouco potencial para sistemas de micropropagação.

Dornelas e Vieira (1994) avaliaram o efeito de diferentes fontes de explante, concentrações de fitorreguladores e água de coco na cultura *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores observaram que a formação de gemas ocorreu sem a fase de calo e que o meio MS, acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BA e 10% de água de coco, favoreceu a organogênese nos explantes cotiledonares e hipocotiledonares, enquanto para os explantes foliares foram necessárias concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de BA e 10% de água de coco para promover a organogênese. Similarmente, Hall et al. (2000) verificaram a influência do explante bem como da adição de água de coco na organogênese do híbrido australiano *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores enfatizaram que os explantes cotiledonares foram mais eficientes que os explantes foliares no processo de regeneração e que a adição de 10% de água de coco ao meio MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de BA promoveu um rápido desenvolvimento de gemas.

Kawata et al. (1995) observaram que os explantes foliares de *P. edulis* Sims var. *maracuja peroba* formaram gemas em MS contendo 0,22 mg L⁻¹ de BA e 0,20 mg L⁻¹ de

AIB. Rodriguez et al. (1999) verificaram a formação de gemas nos discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* cultivados em MS acrescido de BA e TDZ (tidiazuron), sendo que as gemas induzidas em meio com BA alongaram mais rapidamente do que aquelas induzidas com TDZ. Para os explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* 'Golden Star' inoculados em meio MS sob diferentes concentrações de BA (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 mg L⁻¹), a concentração de 0,6 mg L⁻¹ promoveu a formação de gemas e calo e, a dose de 1,2 mg L⁻¹ de BA, favoreceu a organogênese direta (Otaola, 2000).

Faria e Segura (1997) obtiveram gemas a partir de ápices caulinares de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados em MS contendo diferentes concentrações de BA (0,45; 1,12 e 4,5 mg L⁻¹). Ocasionalmente, esses autores verificaram a formação de calo nos explantes cultivados em meio contendo 4,5 mg L⁻¹, porém a proliferação de gemas ocorreu diretamente nesses explantes.

Biasi et al. (2000), avaliando a indução da organogênese em segmentos entrenodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* obtidos a partir de plântulas provenientes de casa de vegetação, observaram que as concentrações de 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de BA possibilitaram a formação de gemas associadas com a proliferação de calo, cerca de 20 dias após inoculação em meio MS. Os autores frisaram que, apesar do fitorregulador promover a formação de um grande número de gemas, seu efeito residual pode ter afetado o seu alongamento. Da mesma forma, Takahashi (2002) verificou que os segmentos de entrenó de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* população Sul Brasil inoculados em MS contendo 0,5 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco formaram calo. A autora não observou a formação de gemas a partir desses calos, somente primórdios foliares.

Isutsa (2004), visando desenvolver um protocolo para micropropagação de *P. edulis* var. *edulis* e *P. edulis* var. *flavicarpa*, inoculou ápices caulinares em MS contendo 5,0 mg L⁻¹ de BA e constatou que para *P. edulis* var. *edulis* houve necessidade de adicionar 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ ao meio de cultura. Segundo o autor, a proliferação desta espécie é considerada difícil quando comparada à *P. edulis* f. *flavicarpa*, concluindo que as variedades de maracujá requerem diferentes fitorreguladores para o sucesso da sua micropropagação.

De acordo com Becerra et al. (2004), a idade e a condição fisiológica dos explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa* também afetam a morfogênese *in vitro*. Os autores avaliaram a regeneração *in vitro* a partir de explantes foliares cultivados em MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA e 0,47 mg L⁻¹ de AIB. Os explantes eram provenientes de casas de vegetação e com idades entre 1 e 6 meses. Esses pesquisadores constataram o

aparecimento de gemas após 15 dias de inoculação *in vitro*, sendo que o maior potencial organogênico foi encontrado nos explantes originados de plantas com 2 meses de idade. Similarmente, Hall et al. (2000) compararam a idade dos explantes cotiledonares, também oriundos de casa de vegetação, de *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores relataram que os explantes provenientes de plantas com 30 dias formaram 86% de gemas, enquanto os explantes de plantas com 60 e 90 dias apresentaram, respectivamente, 38% e 37% de gemas originadas diretamente nos explantes cotiledonares.

Como mencionado, a organogênese indireta também foi constatada para algumas espécies de *Passiflora*. Monteiro et al. (2000) observaram a formação de calo nos explantes foliares de *P. suberosa* cultivados em meio contendo 0,5 mg L⁻¹ ou 1,0 mg L⁻¹ de BA. Os autores relataram que os calos formados não produziram gemas no meio de indução, somente quando transferidos para meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de GA₃.

Em experimentos realizados por Lombardi et al. (2003), os discos foliares de *P. cincinnata* Mast. originaram gemas a partir do calo formado em meio contendo BA, enquanto nos segmentos de raízes as gemas formaram-se diretamente a partir de tais explantes ou indiretamente a partir do calo. Segundo as autoras, os melhores resultados para a organogênese *in vitro* foram obtidos quando se usou de 0,5 a 1,5 mg L⁻¹ de BA.

Diante do exposto, observa-se que em *Passiflora* o fitorregulador BA é o mais utilizado sendo que, dependendo da fonte de explante, há diferentes respostas quanto à produção de gemas.

2.2 Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro*

A organogênese *in vitro* é precedida pelo aparecimento de meristemóides. Estas populações de células meristemáticas são formadas tanto direta quanto indiretamente durante o cultivo *in vitro*. Dhaliwal et al. (2003) observaram que em *Nicotiana tabacum* L. 'Wisconsin 38' as gemas originaram-se a partir de meristemóides formados nas células do parênquima paliçádico na superfície adaxial do explante foliar, e os primórdios radiculares formaram-se a partir dos meristemóides originados nas células do parênquima vascular e células da bainha. Além disso, a pesquisa enfatizou a plasticidade do meristemóide, revelando que os centros meristemáticos determinados para originarem gemas não formaram primórdios radiculares, e aqueles ainda não determinados foram inibidos ou reverteram a tecido parenquimático. Tal observação foi constatada por meio de

experimentos envolvendo a transferência recíproca dos explantes foliares do meio de cultura de indução de gemas para o meio de indução de raízes e vice versa (Dhaliwal et al., 2003).

Para *Stylosanthes scabra*, as análises histológicas dos explantes cotiledonares revelaram que as gemas tiveram origem na região periférica do calo (Dornelas et al., 1992). Os estudos histológicos em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. sugeriram ocorrer um processo organogênico direto em que os meristemóides formaram-se a partir de células epidérmicas da face adaxial da lâmina foliar e das células epidérmicas e subepidérmicas da superfície abaxial da nervura central após 35 dias da inoculação (Pereira et al., 2000). Em *Drosera rotundifolia* L., a organogênese direta também foi verificada a partir das células epidérmicas dos explantes foliares (Bobák et al., 1995). Nos explantes foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* a formação de meristemóides ocorreu a partir das células do parênquima paliçádico em alguns setores do mesófilo e, simultaneamente, de células do parênquima fundamental da superfície adaxial da nervura, caracterizando a regeneração direta (Apezzato-da-Glória et al., 1999). Os estudos acima mencionados para espécies de diferentes famílias, possibilitaram verificar que, no processo organogênico *in vitro*, a formação de meristemóides tendeu a ocorrer nas camadas superficiais do calo (via indireta) ou do tecido do explante (via direta).

Ovecka et al. (2000) estudaram as similaridades e as diferenças na formação de gemas durante a organogênese direta e indireta de *Papaver somniferum* L. Os autores relataram que as gemas originaram-se das camadas celulares superficiais do hipocótilo de embriões somáticos e que todas as células ativadas tornaram-se determinadas e envolvidas na formação do primórdio de gema. Por outro lado, na via indireta de regeneração, somente as células periféricas dos meristemóides adquiriram competência morfogênica.

Biasi et al. (2000), estudando a indução da organogênese *in vitro* em segmentos entrenodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* obtidos a partir de plântulas provenientes de casa de vegetação, observaram a proliferação de calo na região seccionada dos explantes e a formação de gemas a partir dessa região. Os autores ressaltaram que a origem superficial das gemas seria favorável para a transformação genética de plantas via *Agrobacterium*. Igualmente, em *Eucalyptus gunnii* Hook., Hervé et al. (2001) enfatizaram a importância da origem superficial das gemas para o processo de transferência de genes. Esses autores constataram que as gemas originaram-se nas camadas periféricas de protuberâncias formadas nos explantes foliares e nodais. Essas protuberâncias exibiram estrutura

organizada composta por células epidérmicas, parênquima, elementos vasculares e células meristemáticas.

Os estudos histológicos realizados por Stipp et al. (2001) evidenciaram que os explantes cotiledonares e foliares de *Cucumis melo* var. *inodorus* 'Yellow Queen', 'Yellow King' e o híbrido AF-222 produziram protuberâncias com epiderme contínua. Tais protuberâncias apresentaram tricomas na sua superfície, indicando que essas formações seriam primórdios foliares. Os autores enfatizaram que as análises histológicas foram decisivas para a caracterização da organogênese, pois a ausência do meristema apical nas estruturas formadas *in vitro* justificou a baixa regeneração das plantas.

Em *Stylosanthes guianensis* as áreas meristemáticas formadas no calo de explantes cotiledonares originaram primórdios foliares e, na base desses primórdios, as células subepidérmicas dividiram-se, formando novas áreas meristemáticas, as quais originaram gemas caulinares (Vieira e Appezzato-da-Glória, 2001). Processo similar foi descrito para os explantes entrenodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* população Sul Brasil por Takahashi (2002).

Gatz (2002) procurou determinar o sítio exato de formação das gemas nos explantes (cotiledonar, nó cotiledonar e hipocótilo) de *Capsicum annuum* L. 'Bryza', evidenciando que não houve a produção de calo. O pesquisador observou divisões celulares na camada epidérmica e nas subepidérmicas dos explantes após o 3º dia de cultivo *in vitro*. Essas divisões formaram meristemóides que puderam ser identificados como protrusões na superfície do explante após 15 dias em cultura.

Cabe salientar que a especialização das células dos meristemóides é considerada um pré-requisito para o desenvolvimento do primórdio de gema (Ovecka et al., 1997). As análises ultra-estruturais dos calos de *Nicotiana tabacum* L. 'Wisconsin 38', obtidos a partir de segmentos de caule inoculados *in vitro*, mostraram que durante a formação dos meristemóides, os depósitos de amido diminuíram progressivamente, indicando que essa reserva pode ser utilizada como fonte de energia para as células dos meristemóides (Ross et al., 1973). Por outro lado, o amido estocado em áreas do tecido que não formaram gemas permaneceu no tecido durante o desenvolvimento do meristemóide, desaparecendo somente com o desenvolvimento das gemas (Ross et al., 1973). Em calos organogênicos de *Papaver somniferum* L., o acúmulo de amido nas áreas adjacentes do calo foi considerado uma fonte de energia para as divisões celulares e formação de novos tecidos durante o processo organogênico (Samaj et al., 1990).

Ovecka et al. (1997) observaram que as células dos meristemóides de *Papaver somniferum* diferiram de acordo com sua localização: as células periféricas dividiram-se rapidamente e apresentaram alta densidade citoplasmática, enquanto as células centrais raramente dividiram-se e mostraram considerável quantidade de amido. Esses autores verificaram que a degradação do amido aumentou durante a maturação do meristemóide e o desenvolvimento do primórdio de gemas. Recentemente, em *Glycine max* (organogênese direta) e *Bauhinia forficata* (organogênese indireta), a presença de grãos de amido nos plastídios das células em divisão dos meristemóides, característica que parece ser comum ao processo organogênico, pode estar associada ao alto requerimento nutricional das populações de células (Appizzato-da-Glória e Machado, 2004). Na organogênese indireta de *Papaver somniferum*, as células centrais dos meristemóides apresentam reservas na forma de amido e lipídios, indicando alta atividade metabólica (Ovecka et al., 2000).

As células envolvidas no processo organogênico, principalmente na via indireta, podem apresentar características ultra-estruturais associadas às variações genéticas detectadas nas plantas originadas a partir dessa via de regeneração (Silvarolla, 1992). De acordo com Bayliss (1980), existe uma alta probabilidade de ocorrer variação cromossômica nas células do calo. Os autores ressaltaram que todas as formas de mudanças cromossômicas podem ser conseqüência direta do crescimento em cultura.

Cionini et al. (1978) induziram a produção de calo a partir de cotilédones imaturos de *Vicia faba* var. *aguadulce* em meio contendo diferentes combinações dos fitorreguladores AIA, 2,4-D e cinetina. Os pesquisadores verificaram a baixa ocorrência de mitoses nos núcleos intactos (euplóides) e também nos fragmentos nucleares (aneuplóides). Segundo Wilson (1925), o processo de fragmentação nuclear caracteriza-se pela persistência do envoltório nuclear e nucléolo e perda da condensação cromossomal, da formação do fuso mitótico bem como da formação do fragmoplasto. A amitose é uma alternativa para a mitose que freqüentemente acompanha a diferenciação celular em um organismo eucariótico (De La Torre e Gimenez-Martin, 1975).

Nas células do calo de *Phaseolus vulgaris* L. 'Bush Blue Lake 274', Fasseas e Bowes (1980) documentaram que a divisão amitótica foi precedida pelo desenvolvimento de múltiplos nucléolos e o envoltório nuclear tornou-se profundamente lobado levando, posteriormente, à separação em dois núcleos.

Calos de *Pisum sativum* L. 'Dolce Provenza' e da linhagem 5075, formados a partir de ápices vegetativos cultivados em MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BA e 0,2 mg L⁻¹

ANA, apresentaram células aneuplóides originadas de um processo de fragmentação nuclear e, as plantas regeneradas eram diplóides ou mosaicos cromossomais havendo, durante o seu desenvolvimento, uma vantagem seletiva das plantas diplóides (Natali e Cavallini, 1987).

Altamura et al. (1991) cultivaram explantes entrenodais de *Nicotiana tabacum* com o objetivo de induzir rizogênese. Estes autores relataram alterações nucleares anteriores ao processo de divisão amitótica: os núcleos apresentaram-se elípticos, fusiformes ou reniformes e altamente cromofílicos, exceto na região correspondente ao plano de constrição; os nucléolos tornaram-se densamente corados. O processo de divisão destes núcleos ocorreu por clivagem resultante de uma constrição que se desenvolveu em um plano perpendicular ou oblíquo ao seu eixo longitudinal, iniciando-se de um ou dos dois lados opostos do núcleo. Entretanto, para Fournier et al. (1991), as profundas invaginações observadas nas membranas nucleares das células dos calos derivados de protoplastos de *Glycine max* L. Merr. 'Labrador' envolvidas na regeneração, aumentaram a superfície de trocas entre núcleo e citoplasma. Além das invaginações do envoltório nuclear, os autores também verificaram a presença de inúmeras mitocôndrias ao redor do núcleo e localizadas no interior das invaginações e a proliferação de dictiossomos e retículo endoplasmático, ressaltando que essas características ultra-estruturais poderiam corresponder a um estado intermediário necessário para a obtenção de potencial regenerativo. As características ultra-estruturais das células normais (dependentes de auxina) e habituadas (independentes de fitorreguladores) dos calos de *Beta vulgaris* var. *altissima*, mostraram que os núcleos das células habituadas exibiram envoltório nuclear irregular, sendo tal característica um indicativo do aumento da superfície de troca entre núcleo e citoplasma (Crèvecoeur et al., 1992).

Altamura et al. (1995) observaram que, explantes de camadas celulares finas e de medula de *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' mostraram divisões amitóticas no tratamento contendo AIA. Nos explantes entrenodais de *Pisum sativum*, o processo de fragmentação nuclear também foi constatado (Gantchev e Bleiss, 1994).

A amitose foi a principal via de divisão nas células do calo de *Allium sativum* L. 'Red Six Cloves'. Nestas células, a superfície do envoltório nuclear formou profundas fissuras e as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e os microtúbulos localizaram-se no interior dessas fissuras (Wang et al., 1998). Recentemente, as análises ultra-estruturais das células envolvidas na organogênese *in vitro* de *Bauhinia forficata* e de *Glycine max* revelaram que as células dos meristemóides originados a partir do calo de *B. forficata*

apresentaram fragmentos de cromatina interfásica dispersos no citoplasma, indicando a ocorrência de amitose. Entretanto, tal característica não foi observada na organogênese direta de *G. max* (Apezzato-da-Glória e Machado, 2004).

De acordo com Bayliss (1980), os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura para estimular o crescimento desorganizado e a divisão celular, aumentam a incidência de anormalidades mitóticas e o seu principal efeito é induzir tanto a mitose normal como a fragmentação nuclear irregular. Esta fragmentação nuclear irregular deve contribuir para a variação cromossômica da cultura resultante (Bayliss, 1980).

2.3 Água de coco e o cultivo *in vitro*

A água de coco contém sais minerais, mio-inositol e citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos (Caldas et al., 1999), sendo utilizada para o cultivo de células e tecidos *in vitro*.

Kantharajah e Dodd (1990) verificaram que a adição de 20% de água de coco ao meio MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de BA elevou significativamente a produção de gemas de *Passiflora edulis* 'Norfolk Island'.

Diferentes concentrações de água de coco (0; 0,5; 10 e 20%) foram avaliadas sobre o cultivo *in vitro* de explantes cotiledonares, hipocotiledonares e foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, sendo que a concentração de 10% de água de coco foi suficiente para elevar o número de gemas (Dornelas e Vieira, 1994). Similarmente, a adição de 10% de água de coco promoveu rápido desenvolvimento de gemas e, em combinação com BA, aumentou a porcentagem de explantes com gemas de 17 para 80% do híbrido *P. edulis* x *P.edulis* f. *flavicarpa*, mostrando que a água de coco contém substâncias de crescimento essenciais para a regeneração (Hall et al., 2000).

Al-Khayri et al. (1992) examinaram a influência de várias concentrações de água de coco na indução de calos a partir de discos foliares e na regeneração de gemas de *Spinacia oleracea* L. 'High Pack' e 'Baker'. Os autores constataram que a adição de 15% de água de coco ao meio de cultura aumentou o crescimento do calo, o potencial regenerativo e o crescimento das gemas para ambos os cultivares avaliados.

Acacia sinuata (Lour.) Merr., espécie encontrada nas florestas tropicais da Índia e países asiáticos, produziu uma média de 25,3 gemas nos calos formados a partir de

explantes cotiledonares inoculados em meio de cultura contendo a combinação de BA, zeatina e 10% de água de coco (Vengadesan et al., 2003).

De acordo com Tefera e Wannakrairoj (2004), o meio basal MS suplementado com 5% de água de coco intensificou o crescimento e o desenvolvimento das gemas dos explantes de *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep. Esses autores utilizaram diferentes concentrações da água de coco (0; 5; 10; 15 e 20%) para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropropagação para a espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Indução da organogênese *in vitro* em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. população FB - 100

3.1.1 Obtenção de material vegetal

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. população FB – 100) é destinado à indústria de suco (Vieira e Carneiro, 2004). Sementes desta espécie, provenientes do Viveiro Flora Brasil, Araguari – MG, foram desinfestadas com uma solução de benomyl 1,0 g L⁻¹ (p/v) e mantidas “overnight” sob agitação de 130 rpm. Em seguida, foram esterilizadas com álcool 70% por 40 s, imersas em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v) contendo 2 a 3 gotas de Tween 80 por 30 min e submetidas a lavagens sucessivas com água destilada deionizada e esterilizada.

As sementes foram escarificadas com bisturi e inoculadas em meio de cultura contendo a metade da concentração de sais de Murashige e Skoog (1962) (MS/2), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma). A germinação ocorreu em sala de cultura com 30 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 h. A região hipocotiledonar das plântulas obtidas *in vitro*, 15 a 20 dias após a germinação, foi removida em câmara de fluxo laminar e utilizada como fonte de explante. A região terminal das plântulas, constituída pela gema apical e pelo primeiro e segundo nós, cada qual com sua folha, situados logo abaixo da gema apical, foi isolada e colocada novamente no meio de germinação. Este procedimento visou o desenvolvimento da gema apical para que, posteriormente, as folhas fossem utilizadas como fonte de explantes.

3.1.2 Organogênese *in vitro*

Para o estudo da organogênese *in vitro*, foram utilizados segmentos de hipocótilo (8 a 10 mm de comprimento) e discos foliares (8 mm) como fontes de explante. Os

segmentos de hipocótilo, dispostos horizontalmente, e os discos foliares com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura, foram inoculados em placas de Petri de vidro (12 x 90 mm) contendo 20 mL de meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA (Dornelas e Vieira, 1994; Biasi et al., 2000) e 5% (v/v) de água de coco (Takahashi, 2002), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,8 g L⁻¹ de Phytigel como agente solidificante. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem realizada a 120°C, a 1 atm por 20 min. Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob a temperatura de 25 ± 2°C e 16 h de fotoperíodo, sob luz branca fria e radiação luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

3.1.3 Efeito da água de coco na organogênese *in vitro*

Segmentos de hipocótilo (8-10 mm de comprimento), dispostos horizontalmente, foram inoculados e mantidos nas condições descritas no item 3.1.2. Porém, o meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA foi suplementado ou não com 5% (v/v) de água de coco.

3.2 Análises histológicas

Explantes foliares (6 amostras) e hipocotiledonares (37 amostras), coletados em diferentes dias de cultivo *in vitro*, foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), levados a uma bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos, desidratados em série etílica e infiltrados com resina plástica (Leica Histo-resin). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (Leica) com navalha do tipo C; as secções com 5 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine, 1921) pH 4,5 e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck). Para evidenciar proteínas totais, foi empregado o corante “Aniline blue black” (Fisher, 1968). O corante corifosfina (Weis et al., 1988) foi usado para localização de pectinas. Para visualizar a fluorescência induzida pela corifosfina, foi utilizado microscópio Leica DM LB com filtros para excitação azul (450-490 nm) e verde (546 nm).

As fotomicrografias foram feitas com câmera Nikon FX-35DX acoplada ao microscópio Nikon Labophot ou ao estereomicroscópio Nikon SMZ-2T. As escalas

micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas utilizadas. Também foi realizada a captura de imagens a partir das lâminas usando câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DM LB.

3.3 Análises ultra-estruturais

3.3.1 Análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Para a caracterização da micromorfologia da superfície dos calos, das protuberâncias e das gemas provenientes dos explantes foliares e hipocotiledonares, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, desidratadas em série etílica e, posteriormente, secas ao ponto crítico de CO₂ (Horridge e Tamm, 1969). Em seguida, as amostras foram montadas sobre suportes de alumínio e recobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações foram feitas ao MEV modelos Zeiss–DSM 940A e LEO VP 435 a 10 e 20 kV, respectivamente.

Foram analisadas 27 amostras, sendo 18 de explantes hipocotilenares e 9 de explantes foliares.

3.3.2 Análise ao microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Para a análise ultra-estrutural das protuberâncias ao MET, dois tipos de preparações foram realizados: (1) convencional (segundo Roland, 1978, adaptada por Machado, 1999) e (2) citoquímica – Técnica do ZIO (iodeto de zinco–tetróxido de ósmio), (Reinecke e Walther, 1978). Foram processadas 32 amostras das quais 13 foram analisadas, sendo 8 da via organogênica direta e 5 da via indireta.

A preparação convencional consistiu na fixação das amostras em Karnovsky, pós-fixação por 2 h em tetróxido de ósmio 1% e incubação por 2 h em solução aquosa de acetato de uranila 0,5%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de soluções de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e embebidas em resina Araldite e acetona 100% por 48 h. A polimerização foi feita a 60°C por 48 h. As secções semifinas (0,5 µm) foram coradas com mistura de azul de toluidina 1%, enquanto as secções

ultrafinas (50 nm) foram contrastadas com acetato de uranila (Watson, 1958) e com citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

Com a finalidade de evidenciar as organelas e/ou sistemas de membranas envolvidos na diferenciação das protuberâncias, as amostras foram submetidas à preparação citoquímica – Técnica do ZIO. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky e, após esse período, lavadas em solução de sacarose 8,5% preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 e, posteriormente, em tampão TRIS – aminometano pH 4,5. A incubação foi feita em uma solução contendo 3,0 g de Zn, 1,0 g de I, tampão TRIS-aminometano e OsO₄ a 2% (Reinecke e Walther, 1978) por 17 h a 10°C, no escuro. A desidratação, embebição, infiltração e microtomia seguiram o protocolo da preparação convencional descrito anteriormente.

Tanto para a preparação convencional quanto para a citoquímica as observações foram realizadas ao MET Philips modelo CM 100, a 60 kV.

3.4 Análises estatísticas

3.4.1 Ensaio 1

O delineamento inteiramente casualizado foi usado para as análises dos dois tipos de explantes (tratamentos): disco foliar e hipocótilo. As parcelas constituíram-se de 5 ou 6 placas (repetições) com 8 explantes. No 15^o dia, verificou-se a proporção de explantes que apresentou resposta morfogênica em cada placa (formação de calo, folha, protuberância ou gema adventícia).

Os dados de proporções foram analisados usando um modelo de regressão binomial que é um dos casos dos modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972). Detalhes do procedimento estatístico encontram-se no Apêndice I.

3.4.2 Ensaio 2

Considerando o ensaio descrito no item 3.4.1, no 30^o dia de cultura realizou-se contagem do número de protuberâncias e gemas (variáveis) advindas de cada tipo de explante. Como os dados eram provenientes de uma contagem, considerou-se o Modelo de Poisson. Detalhes do procedimento estatístico encontram-se no Apêndice II.

3.4.3 Ensaio 3

Visando avaliar a influência da adição de água de coco no meio de cultura (item 3.1.3), instalou-se um ensaio inteiramente casualizado, com dois tratamentos: meio MS com 5% (v/v) de água de coco e o mesmo meio desprovido desse componente. As parcelas foram constituídas de 5 (repetições) com 8 explantes. Nos 15^o e 30^o dias foram feitas as contagens do número de gemas e de protuberâncias. Como os dados eram provenientes de contagem, o modelo considerado foi o Modelo de Poisson. Detalhes do procedimento estatístico encontram-se no Apêndice III.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. população FB - 100

As análises anatômicas seqüenciais e periódicas do explante hipocotiledonar revelaram que no 1º dia de cultivo *in vitro* em MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco não houve qualquer alteração desse explante (Figura 1A). A partir do 2º dia de cultura, foi possível verificar divisões nas células dos parênquimas cortical e medular próximas à superfície de seccionamento do explante (Figura 1B). Esse processo contínuo de divisão celular originou áreas meristemáticas periféricas, apresentando divisões intensas nas camadas epidérmica e subepidérmicas do explante hipocotiledonar (Figura 1C), cerca de 5 dias após a inoculação *in vitro*. Em algumas regiões dessas áreas de mitose, grupos de células meristemáticas tornaram-se isoladas das demais, formando meristemóides (Figuras 1D e 2A). Alguns desses meristemóides desenvolveram-se em estruturas estreitas e alongadas (Figura 2B) que originaram primórdios foliares (Figura 2C), enquanto outros meristemóides formaram estruturas de maior diâmetro (0,5 a 2,0 mm) que, no presente trabalho, receberam a denominação de protuberâncias (Figura 2D-F). Eventualmente, os meristemóides formaram gemas. Os estudos ao microscópio eletrônico de varredura mostraram que essas protuberâncias formaram-se diretamente a partir do explante hipocotiledonar, possuíam contorno bem delimitado (Figura 3A-C) e apresentaram potencial para formar mais de uma gema adventícia na sua superfície (Figura 3C).

As protuberâncias (Figura 4A-F) eram constituídas por diferentes tipos celulares e recobertas por substância de natureza péctica. Apresentavam revestimento epidérmico unisseriado contínuo (Figura 4A-D) o qual, juntamente com as camadas subepidérmicas, constituíam as células periféricas da protuberância. Em quase toda a extensão dessas protuberâncias, as células periféricas apresentavam aspecto meristemático: tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleo e nucléolo evidentes (Figura 4B). Somente essas células periféricas formavam gemas (Figura 4E-F) e/ou primórdios foliares (Figura 4F). Além das células periféricas, as protuberâncias possuíam células centrais

parenquimáticas e elementos traqueais (Figura 4B-D e 4F). Similarmente, Hervé et al. (2001) verificaram a formação de gemas a partir de protuberâncias formadas nos explantes foliares, entrenodais e nodais de *Eucalyptus gunnii* Hook. Segundo os autores, o estudo histológico dessas protuberâncias revelou a presença de células epidérmicas, células parenquimáticas, elementos vasculares e células meristemáticas, sendo que as gemas originaram-se das camadas periféricas constituídas por células epidérmicas e subepidérmicas de tamanho pequeno e citoplasma denso, como observado no presente estudo. Contudo, as protuberâncias descritas por Stipp et al. (2001) para os explantes cotiledonares e foliares de *Cucumis melo* var. *inodora* apresentaram epiderme contínua com tricomas na sua superfície, indicando que tais protuberâncias poderiam ser primórdios foliares. Os autores enfatizaram que as análises anatômicas das estruturas aparentemente identificadas em cultura como gemas eram, de fato, protuberâncias e primórdios foliares mencionando a ausência de meristema apical caulinar associado a tais estruturas.

As análises morfo-anatômicas dos explantes hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* mostraram a assincronia do processo organogênico: gemas, estruturas foliares e protuberâncias puderam ser observadas em diferentes etapas de desenvolvimento em um mesmo explante (Figura 5A-D) e em explantes com diferentes dias de cultivo *in vitro* (Figura 5A-F), sendo possível identificar gemas a partir do 13º dia de cultura (Figura 5A).

Convém salientar que somente as células da região periférica das protuberâncias aqui estudadas originaram gemas (Figuras 4F e 5F). Entretanto, Ovecka et al. (2000) verificaram que centros meristemáticos (denominados pelos autores como nódulos organogênicos) formados na superfície do hipocótilo de embriões somáticos de *Papaver somniferum* L. apresentaram todas as células sincronizadas e determinadas para originar primórdios de gemas. Já as protuberâncias formadas nos explantes foliares de *Ananas comosus* apresentaram origem endógena e compreenderam centros de células meristemáticas, os quais eram precursores das gemas (Mercier et al., 2003).

No presente estudo, também se verificou que a alteração celular, decorrente da desdiferenciação de células dos parênquimas cortical e medular dos explantes hipocotiledonares, promovia a formação de um pequeno calo na maioria desses explantes, a partir do 10º dia de cultivo *in vitro* (Figuras 6A-B e 7A-B). Cerca de 18 dias após a inoculação, protuberâncias (Figura 6A) e, esporadicamente, gemas (Figuras 6B-C e 7C-D) formaram-se a partir desse calo. Tawfic e Noga (2001) verificaram que a produção de gemas em segmentos de hipocótilo e entrenó de *Cuminum cyminum* L.

ocorreu a partir do desenvolvimento de um tecido com formato circular, semelhante a um calo intumescido, nas extremidades seccionadas do explante e que, posteriormente, gemas foram identificadas nessa região. Assim como observado no presente trabalho, a indução da organogênese em segmentos de entrenó de *P. edulis* f. *flavicarpa*, caracterizou-se pela intensa proliferação celular nas extremidades dos explantes aos 20 dias de cultivo *in vitro* e, embora esse calo não apresentasse características organogênicas, pois as células eram grandes e friáveis, gemas formaram-se a partir dessas regiões (Biasi et al., 2000).

No presente trabalho, explantes foliares cultivados *in vitro* também formaram protuberâncias (Figura 8A-B). Contudo, no decorrer da cultura, verificou-se que essas protuberâncias, formadas diretamente nos explantes, aumentavam em diâmetro e formavam poucas gemas quando comparadas aos explantes hipocotiledonares, como será discutido no item 4.2. Apesar disso, essas protuberâncias apresentaram características anatômicas similares àquelas produzidas nos explantes hipocotiledonares, ou seja, células periféricas meristemáticas, células centrais com características parenquimáticas, produção de substância péctica e elementos traqueais. Dessa forma, algumas das análises anatômicas e ultra-estruturais para identificação de substância péctica e diferenciação de elementos vasculares foram também realizadas em protuberâncias provenientes do explante foliar.

As observações ao microscópio de fluorescência das protuberâncias formadas no explante foliar confirmaram a natureza péctica da substância que envolvia tais estruturas (Figura 8C-D). A análise ao microscópio eletrônico de transmissão confirmou a presença dessa matriz extracelular nas células periféricas das protuberâncias (Figura 9A-F). Em *Papaver somniferum* L., a síntese de mucilagem foi observada durante a diferenciação do meristemóide no estágio de divisão de suas células periféricas e, a presença dessa substância mucilaginosa na superfície dessas células periféricas e a maior espessura das paredes periclinais externas servem como uma separação mecânica entre esses centros meristemáticos (Ovecka e Bobák, 1999). A produção de substâncias extracelulares no processo organogênico *in vitro* não é comparável com a rede fibrilar encontrada na embriogênese somática *in vitro* (Ovecka e Bobák, 1999). A rede fibrilar desempenha função na adesão e reconhecimento celular, promovendo a coordenação dos estágios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos (Dubois et al., 1992).

Ovecka e Bobák (1999) estabeleceram uma correlação entre o acúmulo de mucilagem e o consumo do amido durante o processo organogênico *in vitro* de *Papaver*

somniferum. Os autores verificaram que o acúmulo de amido é um pré-requisito para a formação de gemas e que, durante esse processo, as reservas metabólicas são utilizadas sem a produção proeminente de mucilagem. Os autores consideraram que o acúmulo de mucilagem estaria correlacionado à falha no desenvolvimento do meristemóide em gema e à senescência de tais meristemóides. Contudo, no presente estudo, as protuberâncias exibindo mucilagem na superfície não apresentaram indícios de senescência celular e as células centrais continuaram a exibir amido nos plastídios e proteína nos vacúolos (Figura 9G-H). De acordo com Ross et al. (1973), o acúmulo de amido nos plastídios dos meristemóides formados no calo de *Nicotiana tabacum* L. 'Wisconsin 38' desapareceu durante o desenvolvimento desses meristemóides. Entretanto, os autores constataram que o amido estocado em áreas que não formaram gemas permaneceu nesse tecido durante o desenvolvimento dos meristemóides, considerando essa reserva uma fonte de energia para tais células. Similarmente, o amido das células centrais das protuberâncias aqui analisadas poderia estar fornecendo a energia necessária para a formação de gemas nas camadas periféricas das protuberâncias. Ressalta-se que as propriedades hidrofílicas das substâncias pécticas e seu estado geleificante (Morris et al., 1982) sugerem que o material extracelular nas protuberâncias analisadas possa ter papel na hidratação (Machado e Sajo, 1996) das células periféricas e na manutenção da integridade estrutural (Morris et al., 1982) das protuberâncias.

Uma característica marcante das protuberâncias foi a presença de elementos traqueais entre as células centrais de ambos explantes, hipocotiledonares e foliares (Figuras 4B-D, 4F). A maioria das análises mostrou que as células centrais se diferenciaram diretamente em elementos traqueais (Figura 10A). Porém, algumas vezes, foi possível verificar a formação de elementos traqueais a partir de divisões das células centrais (Figura 10B). De acordo com Fukuda e Komamine (1980), a divisão celular não é um pré-requisito para a formação de elementos traqueais, sendo que na ausência dessas divisões, a diferenciação desses elementos de condução recebe a denominação de transdiferenciação (Sugiyama e Komamine, 1990), como observado no presente estudo. A presença de ANA e BA foram essenciais para a transdiferenciação de elementos traqueais em cultura de células do mesófilo de *Zinnia elegans* (Fukuda e Komamine, 1980). Sugiyama e Komamine (1990) observaram que auxina e/ou citocinina adicionados ao meio de cultura foram indispensáveis para a transdiferenciação de células parenquimáticas em elementos traqueais. Altamura et al. (1995) constataram que a diferenciação do xilema em explantes de *Nicotiana tabacum* L. foi induzida pela auxina

AIA durante o crescimento do calo. De acordo com Gahan et al. (2003), tanto 2,4-D quanto BA induzem à xilogênese. No presente trabalho, a utilização de BA pode ter contribuído para a diferenciação de elementos traqueais nas protuberâncias.

As análises ao microscópio eletrônico de transmissão das células centrais das protuberâncias (Figura 10C-F) permitiram observar que as células em processo de diferenciação vascular apresentaram plastídios alongados (Figura 11A) quando comparados às células não vasculares (Figuras 11B e 12A).

Outra característica marcante dessas células em diferenciação vascular foi a presença de retículo endoplasmático liso e rugoso e de dictiossomas bastante ativos nas proximidades da parede celular (Figura 11C-F). Esses sistemas de membranas podem estar associados ao espessamento parietal, conforme sugerido por Esau (1977) e Burgess e Linstead (1984). A técnica do ZIO possibilitou verificar que algumas membranas dos dictiossomas, bem como as vesículas associadas a estas células, mostraram diferentes intensidades de impregnação por Zn (Figura 11C-D). As variações observadas quanto à impregnação podem ser resultantes da existência de uma polaridade funcional das membranas (Hall et al., 1981). Essa polaridade é reconhecida e destacada em trabalhos da área da Biologia Celular, inclusive relatando diferenças na síntese dos polissacarídeos não celulósicos da parede celular (Buchanan et al., 2000).

Assim como observado nos dictiossomas, o retículo endoplasmático rugoso e o retículo endoplasmático liso apresentaram intensa deposição de Zn após a utilização do método ZIO (Figura 11E-F). Ainda no citoplasma, verificaram-se gotas de óleo dispersas e envolvidas por retículo endoplasmático liso (Figura 11G).

Também foi verificada a presença de vacúolo autofágico nas células em processo de diferenciação vascular (Figura 12A-B). A autofagia pode estar envolvida na degradação do conteúdo celular durante a autólise dos elementos traqueais, visto que a diferenciação desses elementos é uma categoria de morte celular programada em que o vacúolo desempenha papel essencial (Fukuda, 2000). Segundo este autor, o colapso do vacúolo libera enzimas hidrolíticas que degradam, primeiramente, as organelas de membrana única (Golgi e retículo endoplasmático) que intumescem na extremidade e em toda sua extensão e, posteriormente, desaparecem. Em seguida, ocorre a degeneração das organelas com dupla membrana (cloroplastos e mitocôndrias), primeiramente na matriz e depois nas suas membranas (Fukuda, 2000). As mesmas observações foram documentadas no processo de formação de elementos traqueais dos meristemóides de

Passiflora cincinnata Mast. (Apezzato-da-Glória¹). Entretanto, no presente estudo, essas mudanças ultra-estruturais não foram documentadas. Possivelmente, as células centrais das protuberâncias de *P. edulis* f. *flavicarpa* aqui analisadas não se encontravam no mesmo estágio de diferenciação vascular de *P. cincinnata* e, portanto, os eventos morfológicos relacionados à morte celular programada não foram identificados.

Nessa fase do processo de diferenciação vascular, o envoltório nuclear apresentou-se íntegro, como evidenciado na Figura 12C. Nos meristemóides de *P. cincinnata* (Apezzato-da-Glória²) e em células do mesofilo de *Zinnia elegans* cultivadas *in vitro* (Burgess e Linstead, 1984), foram observadas profundas invaginações no envoltório nuclear durante o processo de formação de elemento traqueal.

A formação de elementos traqueais com paredes espessas e lignificadas a partir das células centrais das protuberâncias pode estar associada à retenção de água e ao suporte mecânico, como verificaram Scatena e Nunes (1996) ao analisarem a formação de espessamentos helicoidais de lignina nas paredes dos idioblastos do mesofilo de *Pleurothalis rupestris* Lindl.

A formação das protuberâncias independe se a via organogênica é direta ou indireta. O fator relevante documentado no presente trabalho foi a competência dos explantes foliares e hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* para a formação de gemas a partir dessas protuberâncias.

Segundo Christianson e Warnick (1983, 1985), existem fases distintas para a via organogênica *in vitro*: a) aquisição de competência - habilidade para responder à indução organogênica; b) indução – as células responsivas ao estímulo tornam-se determinadas para formar um órgão; nessa fase, a composição de fitorregulador do meio de cultura é crítica; c) diferenciação morfológica e desenvolvimento – crescimento de gemas ou raízes a partir do explante. No presente trabalho, podem estar ocorrendo falhas na fase de determinação dos centros meristemáticos (meristemóides) formados nos explantes, pois alguns centros meristemáticos, originados tanto direta quanto indiretamente, adquiriram determinação para formarem primórdios foliares e, esporadicamente, gemas. Porém, a maioria dos meristemóides continuou seu desenvolvimento formando protuberâncias.

O período prolongado de cultivo *in vitro* dos explantes nas condições estudadas pode ter levado à falha na determinação das células dos centros meristemáticos que passaram a desenvolver protuberâncias. A superexposição das células às citocininas leva

^{1,2} APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comunicação pessoal, 2005.

à morte celular, fato que pode explicar a falha no desenvolvimento de algumas células ou explantes quando expostos por período prolongado ao fitorregulador (Gahan et al., 2003). A falha na formação dos meristemóides pode ser em decorrência da desdiferenciação incompleta das células epidérmicas que originam os meristemóides, da competição entre células desdiferenciadas ou, ainda, da inibição da indução das gemas por meristemóides formados em áreas adjacentes (Lo et al., 1997).

Para Dhaliwal et al. (2003), os meristemóides determinados para produzir gemas seguem seu caminho de desenvolvimento e aqueles ainda não determinados são inibidos ou reverterem a tecido parenquimático. No presente estudo, a reversão a tecido parenquimático não foi completa, pois conforme comentado, apenas as células centrais da protuberância eram parenquimáticas, enquanto as células periféricas dividiram-se, formando novos meristemóides os quais deram origem às gemas.

Importante evidenciar que as análises estruturais e ultra-estruturais realizadas com *P. edulis* f. *flavicarpa* indicam a necessidade de definir o tempo necessário de indução dos explantes, fato que pode ter contribuído para o desenvolvimento das protuberâncias. Nesse contexto, experimentos envolvendo transferência recíproca de explantes entre meio de indução de gemas e meio basal são conduzidos com objetivo de avaliar a competência e a determinação dos tecidos durante o processo organogênico *in vitro*. Para *Convolvulus arvensis* L. é necessário que os explantes foliares permaneçam em meio de indução por um período de 7 dias para tornarem-se competentes e determinados para a produção de gemas (Christianson e Warnick, 1983). Similarmente, para os explantes foliares de *Nicotiana tabacum* 'Xanthi' nc. e *N. tabacum* 'Wiscosin 38' (Attfield e Evans, 1991; Dhaliwal et al., 2003), 6 dias em meio de indução seria suficiente para a formação de gemas a partir desses explantes. De acordo com Lo et al. (1997), o tecido foliar de *Saintpaulia ionantha* x *confusa* 'Virginia' adquiriram competência para regeneração após 3 dias de isolamento do explante.

Tendo em vista a formação expressiva de gemas a partir das protuberâncias (Figuras 3C e 5E-F) e a diferença estrutural dessas protuberâncias em relação aos meristemóides já descritos na literatura, o estudo ultra-estrutural foi realizado em protuberâncias formadas diretamente no explante (Figura 3A) ou naquelas originadas do calo (Figura 6A).

Os estudos ao microscópio eletrônico de transmissão confirmaram diferenças entre as células periféricas e as centrais encontradas nas protuberâncias. Tanto na via organogênica direta como na indireta, as células centrais (Figura 9G-H) das

protuberâncias apresentaram baixa densidade citoplasmática quando comparadas às células periféricas (Figura 13A-B). As células centrais caracterizaram-se pela presença de grande quantidade de plastídios contendo grãos de amido localizados próximos à parede celular e acúmulo de proteína no vacúolo (Figura 9G-H). Ovecka et al. (2000) observaram que as células centrais dos meristemóides, formados a partir de células do calo de *Papaver somniferum*, apresentaram reservas na forma de amido e lipídios, indicando haver alta atividade metabólica nessas células. O acúmulo de amido precedeu a formação do meristemóide e, conseqüentemente, houve diminuição dessa reserva nas células dos meristemóides (Ovecka e Bobak, 1999). Em *P. edulis* f. *flavicarpa*, apesar das células centrais das protuberâncias não estarem envolvidas diretamente no processo de formação de gemas, estas podem acumular reservas na forma de amido e proteína e, posteriormente, mobilizarem tais macromoléculas para auxiliar no desenvolvimento de gemas.

As células periféricas recém-divididas das protuberâncias formadas diretamente a partir dos explantes foliares e hipocotiledonares apresentaram parede celular delgada (Figura 13B-C) e plasmodesmo promovendo a interação entre as células-filha via simplasto (Figura 13C). Características similares foram constatadas nas células dos meristemóides formados diretamente no nó cotiledonar de *Glycine max* cultivado *in vitro* (Apezzato-da-Glória e Machado, 2004).

Nas proximidades da parede celular das células periféricas recém-divididas, a presença de retículo endoplasmático rugoso foi bastante evidente (Figura 13C-D). Esse sistema de membranas também apresentou arranjo paralelo e encontrou-se distribuído no citoplasma (Figura 14A-B). A associação do retículo endoplasmático rugoso com dictiossomos (Figuras 13D e 14A-B), como verificada nas células periféricas das protuberâncias analisadas, tem sido relacionada com a aquisição de potencial regenerativo (Fournier et al., 1991).

A presença de dictiossomos com alta atividade secretora (Figura 15A-E) pode estar associada com processos de síntese de componentes da parede celular e da matriz de natureza péctica que envolve as células periféricas das protuberâncias (Meyberg, 1988). Em *Glycine max* e *Bauhinia forficata*, a alta atividade dos dictiossomos e o aumento no número dessas organelas nas células dos meristemóides também foram relacionados com a síntese acelerada de componentes da parede celular (Vieira e Apezzato-da-Glória, 2001). Segundo as autoras, independente da via de regeneração *in vitro*, a expressão da capacidade de síntese dos tecidos está associada a uma

reorganização do padrão de crescimento durante a indução da morfogênese *in vitro*. Fournier et al. (1991) relataram que há um padrão ultra-estrutural das células envolvidas com os eventos do processo regenerativo, ou seja, certas características são indicativas de alta atividade metabólica no citoplasma. De acordo com os autores, o citoplasma é rico em organelas, principalmente mitocôndrias com matriz elétron-densa, núcleo central com cromatina bem dispersa, presença de plastídios com grãos de amido, dictiossomas ativos, muitos ribossomos e vacúolos pequenos. Appezzato-da-Glória e Machado (2004) observaram características similares nas células envolvidas no processo organogênico de *Glycine max*.

As células periféricas da protuberância na via indireta de regeneração (Figura 16A-D) foram similares às encontradas na via direta (Figura 13A-B) quanto à presença de proteína no vacúolo e de organelas. A diferença marcante entre as células nas duas vias de regeneração foi encontrada no núcleo. Enquanto na organogênese direta o núcleo apresentou formato circular íntegro (Figura 17A), na via indireta de regeneração ocorreu a formação progressiva de invaginações (Figuras 17B–D, 18A-D e 19A-D) levando o núcleo a apresentar formato irregular (Figuras 18A-D e 20A) e, finalmente, a fragmentar-se (Figura 20D). A presença de constrições no envoltório nuclear e a modificação de seu formato esférico para irregular em protoplastos de *Solanum lycopersicoides* Dun. tiveram como conseqüência a divisão amitótica (Tylicki et al., 2002). Similarmente, Wang et al. (1998), investigando mudanças na ultra-estrutura do núcleo durante o desenvolvimento de calo de *Allium sativum* 'Red Six Cloves', verificaram a formação de invaginações, denominadas por estes autores como profundas fissuras, ao longo do envoltório nuclear e, posteriormente, constrição desse envoltório.

Convém evidenciar que a irregularidade no formato e o desenvolvimento de profundas invaginações no núcleo das células do calo derivado de protoplastos de *Glycine max* aumentaram a superfície de trocas entre núcleo e citoplasma (Fournier et al., 1991). Igualmente, o envoltório nuclear das células habituadas formadas nos calos de *Beta vulgaris* var. *altissima* apresentou formato irregular, indicando aumento na superfície de trocas entre núcleo e citoplasma (Crèvecoeur et al., 1992).

Fournier et al. (1991) observaram a presença de mitocôndrias nas proximidades do núcleo e, algumas vezes, dentro das invaginações nucleares. De fato, nas áreas das invaginações em *P. edulis* f. *flavicarpa*, foi possível constatar a presença de mitocôndrias (Figuras 19A-D) e complexos de poros nucleares em vista tangencial (Figura 20B-C) de tal forma que o número de poros foi superior àquele verificado na via direta de

regeneração, aumentando a produção e transporte de proteínas (Garrido et al.,1995). Esses poros são estruturas dinâmicas que mudam dependendo da necessidade do transporte núcleo-citoplasma (Garrido et al., 1995). Nas células dos meristemóides formados no calo de *Bauhinia forficata* foram verificados numerosos poros nucleares, os quais não foram encontrados nas células dos meristemóides produzidos diretamente no tecido do explante de *Glycine max*, sugerindo que a reprogramação celular durante o processo organogênico indireto exige uma atividade transcricional maior que aquela requerida pelo processo direto (Apezato-da-Glória e Machado, 2004).

Importante salientar que, eventualmente, a observação de núcleos fragmentados possa ser decorrente do efeito do plano de corte; entretanto, a documentação das invaginações e dos complexos de poros nucleares em seção tangencial (Figura 20C) confirmou a ocorrência da fragmentação do núcleo no presente estudo. Segundo Bregoli et al. (1997), a amitose consiste num processo de fragmentação do núcleo e, aparentemente, ocorre na transição de um estado diferenciado para um estado de crescimento desorganizado. Nas células em processo de desdiferenciação de *Nicotiana glauca* a fragmentação nuclear ocorreu em duas ou três partes (Nutti Ronchi et al., 1973). O aparecimento de fragmentos de cromatina interfásica no citoplasma das células recém-divididas dos meristemóides formados indiretamente em *Bauhinia forficata* indicou a ocorrência de fragmentação nuclear múltipla (Apezato-da-Glória e Machado, 2004).

De acordo com Bayliss (1980), a fragmentação do núcleo pode contribuir para a variação cromossômica da cultura resultante. Apezato-da-Glória e Machado (2004) sugeriram que se a variação cromossômica gerada por processos amitóticos puder gerar variabilidade de natureza genética, a via organogênica direta seria mais indicada para obtenção de plantas transgênicas. Entretanto, Nutti Ronchi et al. (1973) ressaltaram que, sob condições apropriadas de cultura, o estado diplóide e uninucleado das células que passaram por processo de fragmentação nuclear pode ser restaurado. Também Tylicki et al. (2002) observaram que, em condições apropriadas de cultura, houve um processo de seleção em que protoplastos anucleados e polinucleados (resultantes de processos amitóticos) foram eliminados, permitindo a estabilização da cultura e, conseqüentemente, a regeneração de plantas geneticamente estáveis.

Importante ressaltar que a origem das gemas está sempre associada à áreas meristemáticas observadas na periferia das protuberâncias, independente da via de regeneração ser direta ou indireta. Essas regiões meristemáticas são constituídas de células competentes para a transformação genética, ou seja, que apresentam

características tais como células pequenas, isodiamétricas com paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente (Sangwan et al., 1992), pois o que se pretende nesta técnica é que o DNA exógeno sofra transfecção para as células em divisão.

4.2 Influência do explante e da água de coco na organogênese *in vitro* de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. população FB - 100

As análises morfo-anatômicas da organogênese *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* indicaram que os explantes foliares e hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco formaram protuberâncias e gemas (Figuras 3A-C e 5A-F).

Como descrito no item 4.1, as gemas originaram-se a partir das camadas periféricas das protuberâncias formadas nos explantes hipocotiledonares (Figuras 3C e 4F). Similarmente ao que ocorre com os segmentos de hipocótilo, os explantes foliares também formaram estruturas foliares e gemas a partir das protuberâncias (Figura 21A-D). Geralmente, gemas e protuberâncias foram observadas na superfície abaxial do explante foliar, principalmente na região da nervura central (Figuras 8A-B, 21A e 22A). Importante considerar que a formação de protuberâncias e gemas na superfície de seccionamento dos explantes hipocotiledonares e na nervura central dos discos foliares pode ser influenciada pelo contato direto com BA, bem como pela posição dos explantes no meio de cultura. Em *Nicotiana tabacum* 'Xanthi' nc., a formação de gemas e raízes nas proximidades das nervuras dos explantes foliares e também na superfície de corte desses explantes pode ocorrer devido ao contato com o meio de cultivo (Attfield e Evans, 1991). Nos segmentos de hipocótilo de *Bixa orellana* L. 'Bico de Pato', cultivados em meio suplementado com citocinina, a organogênese direta ocorreu na região distal desses explantes, enquanto a calogênese foi observada na região basal; tal resposta foi decorrente de um gradiente de auxina endógena, resultando numa alteração do balanço entre auxina e citocinina ao longo da extensão explante (Paiva Neto et al., 2003). Para os segmentos de epicótilo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* L. Raf., a resposta morfogênica foi determinada pela polaridade e posição do explante: a formação de gemas por via direta é observada na região apical de explantes colocados verticalmente com a região basal inserida no meio de cultura e a formação de calo é

favorecida em ambas extremidades dos explantes orientados horizontalmente no meio de cultura (García-Luis et al., 1999).

Cabe salientar que a produção de calo em explantes foliares de *Passiflora* já foi relatada por Kantharajah e Dodd (1990), Otahola (2000), Monteiro et al. (2000), Lombardi et al. (2003). Nos discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* 'Golden Star' foi verificada a presença de calo, porém não ocorreu a formação de gemas a partir desse calo (Otahola, 2000). Em *P. suberosa*, apesar da produção de calo em 100% dos explantes foliares, a formação de gemas a partir dessa região proliferada foi considerada baixa (Monteiro et al., 2000). De acordo com Lombardi et al. (2003), os meristemóides formados no calo dos discos foliares de *P. cincinnata* produziram gemas. Segundo Kantharajah e Dodd (1990), a presença de calo nos explantes foliares de *P. edulis* 'Norfolk Island' pode aumentar o risco de variação somaclonal, destacando que esses explantes apresentaram pouco potencial para regeneração. No presente estudo, somente os explantes hipocotiledonares formaram calo.

As análises estatísticas mostraram que até o 15^o dia de cultivo *in vitro*, os explantes foliares e hipocotiledonares não apresentaram diferença quanto à resposta morfogênica (formação de calo, folhas, protuberâncias ou gemas). Dados da Tabela 1 indicam que o modelo utilizado ajusta-se adequadamente, não demonstrando qualquer evidência de que os tipos de explantes sejam diferentes ($P \geq 5\%$).

Tabela 1. Análise de Deviance dos dados relativos à resposta morfogênica dos explantes foliares e hipocotiledonares aos 15 dias de cultivo em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	Valor p (%)
Explante	1	1,080	29,86
Resíduo	9	13,360	14,70
Total	10	14,440	

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, as análises restringiram-se à contagem do número de protuberâncias e gemas em ambos explantes, tendo em vista que essas formações são interessantes para os estudos de multiplicação *in vitro* e de transformação de plantas.

A avaliação no 30^o dia de cultura indicou que os tipos de explantes foram diferentes a 1% de probabilidade (Tabelas 2 e 3). O explante foliar formou maior número de protuberâncias (223) que o explante hipocotiledonar (85) (Tabela 2), enquanto o número de gemas verificadas nos discos foliares (23) foi menor quando comparado ao

hipocótilo (150) (Tabela 3). Os números totais, apresentados entre parênteses, encontram-se no Apêndice II.

Tabela 2. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de protuberâncias formadas nos explantes foliares e hipocotiledonares aos 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	F	Valor p (%)
Explantes	1	92,51		<0,01
Resíduo	84	96,58	67,56	<0,01

Tabela 3. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de gemas formadas nos explantes foliares e hipocotiledonares aos 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	F	Valor p (%)
Explantes	1	82,02		<0,01
Resíduo	84	90,07	43,96	<0,01

Contrariamente às observações do presente trabalho, Dornelas e Vieira (1994) obtiveram, respectivamente, 46,0 e 18,2 gemas formadas nos explantes foliares e hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* inoculados em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BA e 10% de água de coco. Tais diferenças poderiam ser explicadas pelo genótipo utilizado o qual não foi descrito pelos autores. De fato, Appezzato-da Glória et al. (2003) observaram que *P. edulis* f. *flavicarpa* genótipo Cajuba, nas mesmas condições de cultivo *in vitro* aqui estudadas, formou predominantemente estruturas foliares a partir de explantes cotiledonares e foliares. Neste estudo, a maior frequência de gemas verificadas no hipocótilo deveu-se ao fato de que uma protuberância pode originar mais de uma gema, como revelaram as análises morfológicas e anatômicas da referida estrutura globular (Figura 3C). Apesar das protuberâncias formadas nos discos foliares também apresentarem mais de uma estrutura na sua superfície, essas formações geralmente eram folhas (Figura 21D). Além disso, o desenvolvimento da maioria das protuberâncias dos explantes foliares diferiram daquelas observadas no hipocótilo: enquanto no explante hipocotiledonar as protuberâncias apresentavam-se individualizadas e com a camada epidérmica e as subepidérmicas definidas (Figuras 3A-B e 4A-D), nos explantes foliares, a maioria das protuberâncias apresentava desenvolvimento contínuo em tamanho sem ocorrer a formação de gemas (Figura 22A-D). Possivelmente, a perda de definição das camada epidérmica e das subepidérmicas das protuberâncias dos explantes foliares

(Figuras 22B-C e 23A-B) interferiu no processo de regeneração de gemas, uma vez que os novos meristemóides eram formados a partir das células periféricas.

Como aqui demonstrado, a fonte de explante de um mesmo genótipo pode apresentar respostas diferentes quanto ao processo organogênico *in vitro*. Kantharajah e Dodd (1990) obtiveram gemas a partir de segmentos nodais de *P. edulis* em MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de BA e 20% de água de coco sem a produção de calo. Os autores ressaltaram que os explantes foliares parecem ter pouco potencial para sistemas de micropropagação devido à produção de calo. Segundo Hall et al. (2000), os explantes cotiledonares de *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa* são adequados para a regeneração desse híbrido. Esses autores ocasionalmente observaram o desenvolvimento de gemas nos explantes foliares quando cultivados em MS suplementado com BA e 10% de água de coco, considerando esse explante inadequado como sistema eficiente de regeneração. Importante ressaltar que a idade e a condição fisiológica das plantas doadoras afetam a morfogênese *in vitro* em explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* (Becerra et al., 2004).

Outro caráter morfológico diferencial entre os explantes aqui avaliados foi o fato das gemas originadas nos discos foliares apresentarem características de hiperidricidade (Figura 21A), ou seja, coloração verde escura e aspecto quebradiço e brilhante, como descrito para explantes de *Prunus armeniaca* (Pérez-Tornero et al., 2001). Manders et al. (1994) também verificaram que explantes foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* tornaram-se brilhantes e vitrificados aos 21 dias de cultura. Fatores como concentração e tipo de agente geleificante, altos níveis de reguladores vegetais, baixa intensidade luminosa, genótipo (Pérez-Tornero et al., 2001) e alta umidade (Joyce et al., 2003) podem ocasionar tais sintomas. Whitehouse et al. (2002) avaliaram o crescimento e a rápida multiplicação de gemas de vários híbridos de *Eucalyptus* em meio líquido contendo 0,01 mg L⁻¹ de BA e várias concentrações de um agente anti-hiperidricidade. Os autores constataram que, apesar do aumento na proliferação de gemas como consequência da maior superfície de contato para transporte de nutrientes, esse crescimento foi acompanhado por hiperidricidade. Neste estudo, o aumento no tamanho dos discos foliares com o decorrer da cultura e, conseqüentemente, da superfície de contato com o meio de cultivo, possivelmente, tornou o ambiente interno das placas de Petri mais úmido, conduzindo à hiperidricidade das estruturas regeneradas.

De maneira geral, os dados estatísticos aqui apresentados, juntamente com as observações estruturais, confirmaram a superioridade do explante hipocotiledonar em relação ao foliar. Ambas análises puderam explicar as diferenças de respostas nos

estudos de transformação genética da população FB – 100 a qual está sendo usada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP em ensaios de transformação. Dados desses estudos indicaram a obtenção de cerca de 1,33% (8/5992) de plantas transgênicas a partir de explantes foliares submetidos ao processo de bombardeamento por micropartículas (biobalística) (Castro, 2005). Por outro lado, os explantes hipocotiledonares transformados via *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram 11% de eficiência de transformação, enquanto os discos foliares submetidos a esse mesmo processo produziram 6% de plantas transgênicas (Monteiro, 2005). Essas diferenças se devem ao método usado e também ao explante que recebeu o DNA exógeno. De acordo com Manders et al. (1994), a fonte de tecido de *P. edulis* f. *flavicarpa* usada para co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* influencia o processo de transformação. Os autores relataram que os explantes foliares produziram brotos transgênicos e os explantes caulinares desenvolveram calos transformados. Biasi et al. (2000) mostraram a formação de calo e o desenvolvimento de gemas em explantes entrenodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*, ressaltando que a superficialidade da regeneração é favorável à infecção via *Agrobacterium*. De fato, as análises anatômicas revelaram que as células competentes para regeneração têm origem nas células periféricas das protuberâncias.

Os resultados aqui obtidos indicaram que, a despeito da diferença do método de transformação utilizado, o potencial de regeneração dos explantes certamente interferiu na porcentagem de plantas transgênicas obtidas, ratificando a necessidade dos estudos histológicos e ultra-estruturais em auxílio aos grupos que estudam a transformação genética de plantas.

Assim como o tipo de explante pode exercer influência sobre a resposta morfogênica *in vitro*, a composição do meio de cultura também pode ocasionar mudanças durante esse processo, bem como nos sistemas de micropropagação.

Para algumas espécies vegetais, a adição de misturas complexas ao meio de cultura parece auxiliar no processo de regeneração *in vitro*. O uso de extratos de batata, milho e mamão aumentou significativamente a regeneração *in vitro* de plântulas a partir de protocormos da orquídea *Doritaenopsis*, sendo que esses extratos contêm carboidratos, proteínas, gorduras, várias vitaminas, compostos fenólicos e níveis menores de aminoácidos e ácidos orgânicos e que qualquer uma dessas substâncias, ou alguma outra ainda desconhecida, favorece a regeneração de plântulas (Rahman et al., 2004). Similarmente, a água de coco também pode conter substâncias de crescimento

essenciais para a regeneração *in vitro* (Hall et al., 2000). A adição de 15% de água de coco ao meio MS aumentou significativamente o crescimento do calo, a capacidade regenerativa e o crescimento de gemas em discos foliares de *Spinacia oleracea* L. 'Baker' e 'High Pack' (Al-Khayri et al., 1992). Calos formados a partir de explantes foliares e caulinares de *Solanum trilobatum* L. aumentaram quando o meio MS foi suplementado com 10% de água de coco (Alagumanian et al., 2004). Para a micropropagação de *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep, a suplementação do meio MS com 5% de água de coco foi considerado o melhor tratamento para que os explantes (gemas axilares de rizomas) apresentassem aumento no crescimento e desenvolvimento das gemas (Tefera e Wannakrairoj, 2004).

Protocolos para organogênese *in vitro* de espécies de *Passiflora* podem ou não ser suplementados com água de coco. Kantharajah e Dood (1990), Dornelas e Vieira (1994) e Hall et al. (2000) relataram que suplementar o meio MS com água de coco auxilia na obtenção de gemas *in vitro* de espécies de *Passiflora*. Porém, para outros autores (Manders et al., 1994; Appezzato-da-Glória et al., 1999; Biasi et al., 2000; Monteiro et al., 2000) esse mesmo meio suplementado somente com fitorreguladores sem adição de água de coco foi suficiente para induzir a resposta *in vitro*. Considerando o fato do uso dessa solução orgânica algumas vezes gerar controvérsias entre os autores pela presença de inúmeros componentes que podem exercer influência sobre a resposta morfogênica *in vitro*, as análises a seguir apresentadas procuraram verificar a influência da água de coco adicionada ao meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA no processo de regeneração do genótipo estudado.

Cabe salientar que a eficiência da água de coco no processo organogênico *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi avaliada pelo número de gemas e protuberâncias produzidas nas condições de cultura descritas no item 3.1.3.

As análises estatísticas indicaram que nos dois períodos de cultura analisados (15^o e 30^o dias) não houve diferença, a 5% de probabilidade, entre os tratamentos quando realizada a contagem do número de protuberâncias formadas nos explantes hipocotiledonares (Tabelas 4 e 5, respectivamente).

Tabela 4. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de protuberâncias formadas no explante hipocotiledonar aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	F	Valor p (%)
Meio de cultura	1	0,47		49,4
Resíduo	78	92,41	0,40	52,8

Tabela 5. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de protuberâncias formadas no explante hipocotiledonar aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	F	Valor p (%)
Meio de cultura	1	0,16		68,6
Resíduo	78	83,07	0,13	71,8

Entretanto, para o número de gemas observadas nos explantes hipocotiledonares os dados estatísticos mostraram que houve diferença a 5% de probabilidade (Tabelas 6 e 7, respectivamente) quando o meio MS foi suplementado com água de coco.

Tabela 6. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de gemas formadas no explante hipocotiledonar aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	F	Valor p (%)
Meio de cultura	1	5,12		2,4
Resíduo	78	77,62	3,15	8,0

Tabela 7. Análise de Deviance dos dados relativos à contagem de gemas formadas no explante hipocotiledonar aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Causa de Variação	g.l.	Deviance	Valor p (%)
Meio de cultura	1	5,18	2,30
Resíduo	78	83,18	32,3
Total	79	88,36	

Kantharajah e Dodd (1990) verificaram aumento no número de gemas formadas nos explantes nodais de *Passiflora edulis* 'Norfolk Island' inoculados em meio suplementado com 20% de água de coco. Similarmente, a adição de água de coco ao meio MS influenciou satisfatoriamente a produção de gemas para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Dornelas e Vieira, 1994). De acordo com Hall et al. (2000), o uso de água de coco promoveu rápido desenvolvimento de gemas, bem como aumento do peso dessas estruturas. Os autores ressaltaram que essa suplementação do meio MS melhorou a eficiência da organogênese *in vitro* dos explantes cotiledonares do híbrido *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*. De fato, no presente estudo, os resultados indicaram que os

segmentos de hipocótilo de *P. edulis* f. *flavicarpa* inoculados em meio MS contendo 5% de água de coco apresentaram maior número de gemas e protuberâncias. Contudo, independentemente da adição de água de coco, a organogênese *in vitro*, sob o ponto de vista estrutural, foi similar, ou seja, houve formação de protuberâncias e gemas em ambas condições de cultivo *in vitro* (Figuras 3A-C e 24A-D). Portanto, a adição da água de coco ao meio torna-se uma vantagem para protocolos que visam à transformação genética de plantas no genótipo aqui estudado, uma vez que o número de gemas formado é significativamente superior e morfológicamente similar em ambos tratamentos, como demonstrado.

5 CONCLUSÕES

1 A morfogênese *in vitro* a partir de explantes hipocotiledonares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* ocorre por organogênese direta e indireta, sendo esses processos evidenciados por análises histológicas. A via direta de regeneração caracteriza-se pela formação de protuberâncias diretas originadas a partir de meristemóides formados na camada epidérmica e nas subepidérmicas do tecido do explante. Na via organogênica indireta, as protuberâncias originam-se a partir de meristemóides formados no calo caracterizando as protuberâncias indiretas. Tanto as protuberâncias diretas quanto as indiretas apresentam camadas superficiais meristemáticas que, posteriormente, originam gemas.

2 Nos explantes foliares, somente a via organogênica direta ocorre, sendo que a falta de definição da camada epidérmica e das subepidérmicas das protuberâncias formadas nesse tecido pode interferir na regeneração de gemas.

3 Nas células periféricas das protuberâncias formadas no calo dos explantes hipocotiledonares há ocorrência de fragmentação nuclear.

4 O material extracelular (substância péctica) envolvendo as protuberâncias pode estar associada a uma maior hidratação dessas estruturas e à manutenção da integridade estrutural dessas formações.

5 A adição de água de coco ao meio de cultura não interfere na regeneração *in vitro* sob o ponto de vista estrutural e ultra-estrutural, sendo vantajosa para a micropropagação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGUMANIAN, S., et al. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. **Current Science**, Bangalore, v.86, n.11, p.1478-1480, Jun. 2004.

AL-KHAYRI, J.M., et al. Spinach tissue culture improved with coconut water. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.4, p.357-358, Apr.1992.

ALTAMURA, M.M., et al. Root histogenesis from tobacco thin cell layers. **Protoplasma**, Leipzig, v.161, n.1, p.31-42, 1991.

ALTAMURA, M.M., et al. Morphogenesis in cultured thin layers and pith explants of tobacco. I. Effect of putrescine on cell size, xylogenesis and meristemoid organization. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.1, p.101-106, Oct. 1995.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S.R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.3, p.429-437, jul/set. 2004.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C. Considerações sobre a organogênese *in vitro* em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 2003, Atibaia. **Resumos**. Campinas: Vieira Gráfica e Editora Ltda, v.15, p.176.

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**, Brasília, v.34, n.11, p.2007-2013, nov. 1999.

ATTFIELD, E.M.; EVANS, P.K. Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.234, p.51-57, Jan. 1991.

BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology**, New York, p.113-144, 1980. Supplement 11A.

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**, Dordrecht, v.79, n.1, p.87-90, Oct. 2004.

BIASI, L.A., et al. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.661-665, out/dez. 2000.

BOBÁK, M., et al. Direct plant from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, n.1, p.43-49, Oct. 1995.

BREGOLI, A.M., et al. Nuclear DNA distribution and amitotic processes in activated *Helianthus tuberosus* tuber parenchyma. **Plant Biosystems**, Firenze, v.131, p.3-12, 1997.

BROWN, D.C.W.; THORPE, T.A. Plant regeneration by organogenesis. In: VASIL, I.K.; CONSTABEL, F.; SCHELL, J.; BOGORAD, L. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: plant regeneration and genetic variability**, Orlando: Academic Press. 1986. v.3, p.49-61. ISBN: 0127150013.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p. ISBN 0-943088-39-9.

BURGESS, J.; LINSTED, P. In-vitro tracheary element formation: structural studies and effect of tri-iodobenzoic acid. **Planta**, Berlin, v.160, n.6, p.481-489, May 1984.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPq, 1999. v.1, 1999. p.87-132. ISBN 85-7383-048-4.

CASTRO, A.P. **Resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo via expressão da proteína heteróloga atacina A**. 2005. 151f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Developmental Biology**, New York, v.95, n.2, p.288-293, 1983.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, New York, v.112, n.2, p.494-497, 1985.

CIONINI, P.G.; BENNICI, A.; D'AMATO, F. Nuclear cytology of callus induction and development *in vitro*: I Callus from *Vicia faba* cotyledons. **Protoplasma**, Leipzig, v.96, n.1-2, p.101-112, 1978.

CRÈVECOUER, M., et al. Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugar beet calli. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.30, n.1, p.87-95, 1992.

DE LA TORRE, C.; GIMENEZ-MARTIN, G. The nucleolus in the induced amitosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.26, n.94, p.713-721, Oct. 1975.

DHALIWAL, H.S., et al. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.81, n.6, p.611-621, Jun. 2003.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, n.2, p.211-217, Feb. 1994.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, Oxford, v.70, n.5, p.477-482, Nov. 1992.

DUBOIS, T., et al. SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in roots of *Cichorium*. **Annals of Botany**, Oxford, v.70, n.2, p.119-124, Aug. 1992.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 550p. ISBN: 0-471-24520-8.

FALCO, M.C., et al. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.8, n.2, p.93-97, ago.1996.

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

FASSEAS, C.; BOWES, B.G. Ultrastructural observations on proliferating storage cells of mature cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. cultured *in vitro*. **Annals of Botany**, Oxford, v.46, n.2, p.143-152, Aug. 1980.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v.16, n.1, p.92-96, 1968.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p.361.

FOURNIER, D.; BONNELLE, C.; TOURTE, Y. Ultrastructural features of soybean somatic cells at the beginning of an organogenic process: toward a new concept. **Biology of the Cell**, Ivry sur Seine, v.73, n.1, p.99-105, Jan. 1991.

FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.44, n.3, p.245-253, Oct. 2000.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Plant Physiology**, Rockville, v.65, n.1, p.61-64, Jan. 1980.

GAHAN, P.B., et al. Cytokinin-induced apoptotic nuclear changes in cotyledons of *Solanum aviculare* and *Lycopersicon esculentum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.72, n.3, p.237-245, Mar. 2003.

GANTCHEV, L.; BLEISS, W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on nuclear division in stem segments of *Pisum sativum* L. cultivated *in vitro*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.36, n.3, p.335-342, 1994.

GARCIA-LUIS, A., et al. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, Oxford, v.84, n.6, p.715-723, Dec. 1999.

GARRIDO, D., et al. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. **Protoplasma**, Leipzig, v.186, n.3-4, p.220-230, 1995.

GATZ, A. Histological changes during the adventitious shoot formation in seedling explants of pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v.71, n.4, p.269-274, 2002.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPQ, 1999. v.2, 1999. p.533-568. ISBN 85-7383-048-4.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, Delhi, v.28, n.1, p.74-81, 1978.

HALL, J.L.; FLOWERS, T.J.; ROBERTS, R.M. **Plant cell structure and metabolism**. 2.ed. New York: Longman, 1981. 543p. ISBN 0-582-44408-X.

HALL, R.M., et al. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.48, n.5, p.673-680, 2000.

HERVÉ, P., et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Amsterdam, v.161, n.4, p.645-653, Sep. 2001.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, Lancaster, v.46, n.1, p.1-23, Jan/Mar. 1980.

HICKS, G.S. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v.30, n.1, p.10-15, Jan. 1994.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. **Overdispersion models and estimation**. In: 13^o Sinape, Caxambu, 1998, 73p.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, Washington, v.163, n.3869, p.817-818, 1969.

ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, n.3-4, p.395-400, Feb. 2004.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C.; JAIN, S.M. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, n.2, p.103-121, Aug. 2003.

KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v.65, n.3, p.337-339, Mar. 1990.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

KAWATA, K., et al. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.2, p.281-285, Nov. 1995.

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**. 1. ed. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPq, 1999. v.2, p.519-531. ISBN 85-7383-048-4.

LO, K.H.; GILES, K.L.; SAWHNEY, V.K. Histological changes associated with acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confusa* hybrid (African violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, n.6, p.421-425, Mar. 1997.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Estudo anatômico e fisiológico da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* Mast. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 2003, Atibaia. **Resumos**. Campinas: Vieira Gráfica e Editora Ltda, v.15, p.130.

MACHADO, S.R. **Estrutura e desenvolvimento de nectários extra-florais de *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae)**. 1999. 113f. Tese (Livre-Docência) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1999.

MACHADO, S.R.; SAJO, M.G. Intercellular pectic protuberances in leaves of some *Xyris* species (Xyridaceae). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.74, n.9, p.1539-1541, Sep. 1996.

MANDERS, G., et al. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f.v. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, New York, v.13, n.12, p.697-702, Sep. 1994.

MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.121, n.3, p.404-407, May 1996.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.49, n.1, p.183-186, 1921.

MERCIER, H., et al. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.15, n.2, p.107-112, May/Aug. 2003.

MEYBERG, M. Cytochemistry and ultrastructure of the mucilage secreting trichomes of *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v.62, n.5, p.537-547, Nov. 1988.

MITHILA, J.; HALL, J.C.; VICTOR, J.M.R.; SAXENA, P.K. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Plant Cell Reports**, New York, v.21, p.408-414, 2003.

MONTEIRO, A.C.B.A., et al. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.571-573, jul/set. 2000.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2005. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

MORRIS, E.R., et al. Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. **Journal of Molecular Biology**, London, v.155, n.4, p.507-516, 1982.

MUKHOPADHYAY, A., et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v.11, n.10, p.506-513, Sep. 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NATALI, L.; CAVALLINI, A. Nuclear cytology of callus and plantlets regenerated from pea (*Pisum sativum*) meristems. **Protoplasma**, Leipzig, v.141, n.2-3, p.121-125, 1987.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, Oxford, v.135, p.370-384, 1972.

NUTI RONCHI, V.; BENNICI, A.; MARTINI, G. Nuclear fragmentation in dedifferentiating cells of *Nicotiana glauca* pith tissue grown *in vitro*. **Cell Differentiation**, Amsterdam, v.2, p.77-85, 1973.

OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, v.12, n.3, p.71-74, 2000.

OVECKA, M.; BOBÁK, M. Structural diversity of *Papaver somniferum* L. cell surfaces *in vitro* depending on particular steps of plant regeneration and morphogenetic program. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v.21, n.2, p.117-126, 1999.

OVECKA, M.; BOBÁK, M.; SAMAJ, J. Development of shoot primordia in tissue culture of *Papaver somniferum* L. **Biologia Plantarum**, Praha, v.39, n.4, p. 499-506, 1997.

OVECKA, M.; BOBÁK, M.; SAMAJ, J. A comparative structural analysis of direct and indirect shoot regeneration of *Papaver somniferum* L. *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.157, n.3, p.281-289, Sep. 2000.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, n.2, p.159-167, Nov. 2003.

PEREIRA, A.M.S., et al. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.60, n.1, p.47-53, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O., et al. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v.37, p.250-254, Mar/Apr. 2001.

RAHMAN, A.R.M.M., et al. Effects of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Doritaenopsis* orchid. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v.38, n.1, p.55-59, 2004.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v.38, n.2, p.116-124, Mar/Apr. 2002.

REINECKE, M.; WALTHER, C. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. **Journal of Cell Biology**, New York, v.78, n.3, p.839-855, 1978.

REYNOLDS, E.S. Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.17, n.1, p.208, 1963.

ROBLES, M.J.M. Potentiel morphogénétique des entrenodes de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture "in vitro". **Turrialba**, Turrialba, v.29, n.3, p.224-228, Jul. 1979.

RODRIGUEZ, A.P.M.; MONTEIRO, A.C.B.A.; MENDES, B.M.J. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on leaf discs of *Passiflora* spp. cultivated in vitro. In: Congress on in Vitro Biology, 1999, New Orleans. **Addendum booklet**. p.503.

ROSS, M.K.; THORPE, T.A.; COSTERTON, J.W. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. **American Journal of Botany**, New York, v.60, n.8, p.788-795, Sep. 1973.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, n.5, p. 247-249, 1973.

SAMAJ, J.; BOBÁK, M.; ERDELSKY, K. Histological - anatomical studies of the structure of the organogenic callus in *Papaver somniferum* L. **Biologia Plantarum**, Praha, v.32, n.1, p.14-18, 1990.

SANGWAN, R.S., et al. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v.188, n.3, p.439-456, Oct. 1992.

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

SILVAROLLA, M.B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.44, n.5, p.329-335, Sep/Oct. 1992.

STIPP, L.C.L., et al. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, n.1, p.81-89, 2001.

SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro. **International Review of Cytology**, New York, v.196, p.67-84, 2000.

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

TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene *atacina A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 137f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAWFIK, A.A.; NOGA, G. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.66, n.2, p.141-147, 2001.

TEFERA, W.; WANNAKRAIROJ, S. Micropropagation of krawan (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep). **Science Asia**, v.30, p.9-15, 2004.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, K.I.; THORPE, T.A. **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.17-36. ISBN 0-7923-2493-5.

TYLICKI, A., et al. Structural and ultrastructural analysis of *Solanum lycopersicoides* protoplasts during diploid plant regeneration. **Annals of Botany**, Oxford, v.90, n.2, p.269-278, Aug. 2002.

VENGADESAN, G., et al. High-frequency regeneration from cotyledons callus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v.39, n.1, p.28-33, Jan/Fev. 2003.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. **Biotechnology of fruit and nut crops**. CABI Publishing. 2004. p.436-453. ISBN 0851996620.

VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.911-938. ISBN: 85-88473-01-1.

WANG, H.-L., et al. Changes in nuclear ultrastructure during callus development in tissue culture of *Allium sativum*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.41, n.1, p.49-55, 1998.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v.4, p.475, 1958.

WEIS, K.G.; POLITO, V.S.; LABAVITCH, J.M. Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* (Mill) DA Webb) fruits. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 36, n.8, p. 1037-1041, Aug. 1988.

WHITEHOUSE, A.B.; MARKS, T.R.; EDWARDS, G.A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, n.3, p.245-252, Dec. 2002.

WILSON, E.B. **The cell in development and heredity**. 3. ed. New York: Macmillan, 1925. cap.2, p.214-224: Cell division.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1. *P. edulis* f. *flavicarpa* população FB-100 – **A-D.** Cortes longitudinais de explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco. **A.** Explante no 1^o dia de cultivo sem alterações celulares. **B.** Divisões nas células dos parênquimas cortical e medular localizadas próximas à superfície de seccionamento do explante após o 2^o dia de cultura. **C.** Área meristemática formada na camada epidérmica e nas subepidérmicas do explante no 6^o dia de cultivo *in vitro*. **D.** Meristemóide (seta) formado nas camadas superficiais do explante.

Barras: A, B = 100 µm; C = 30 µm; D = 50 µm.

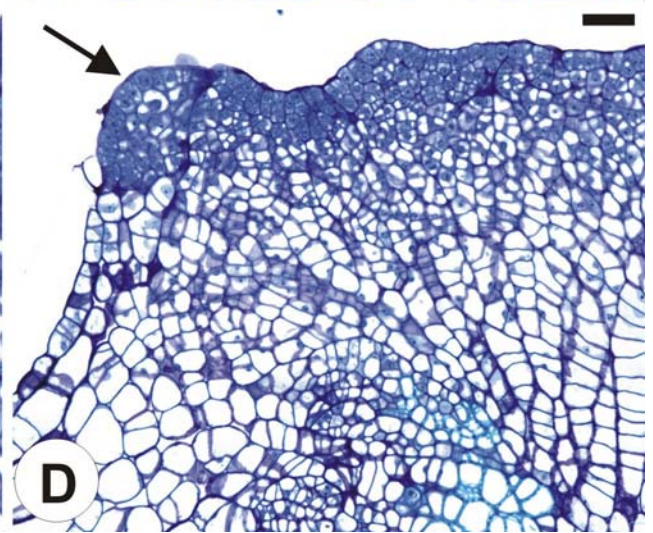
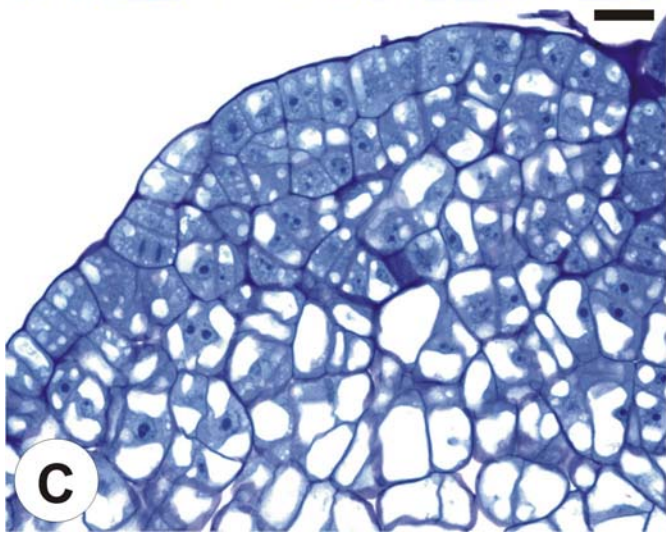
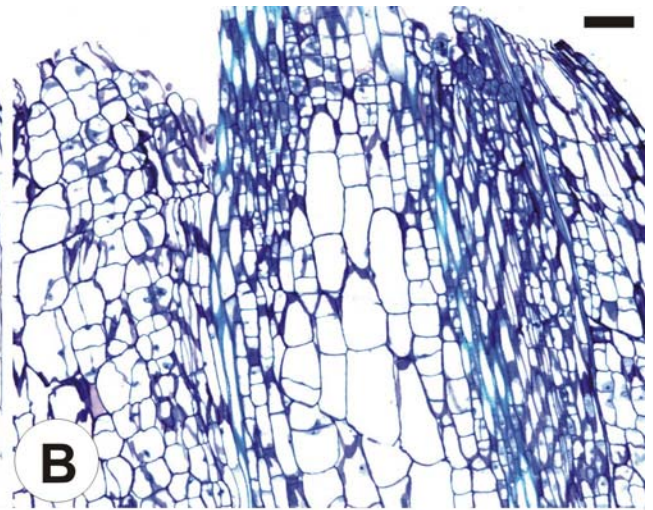
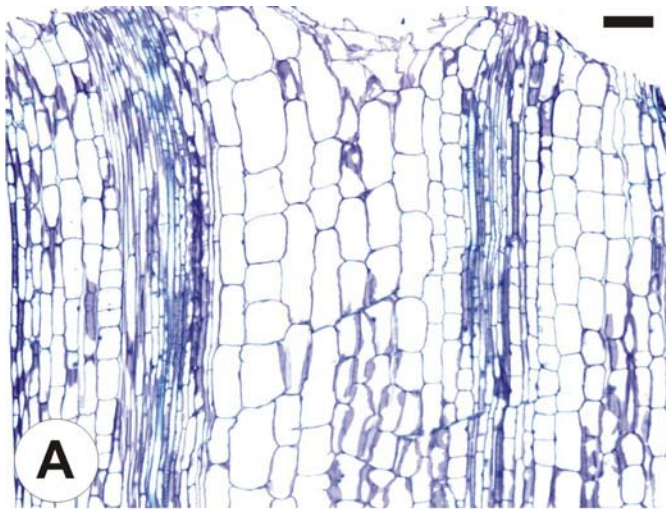


Figura 2. A-F. Cortes longitudinais de explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Meristemóide formado nas camadas periféricas do explante após o 9º dia de cultivo. Esse meristemóide pode se desenvolver em uma estrutura estreita e alongada (**B**), originando primórdio foliar (**C**, setas), ou pode formar estruturas de maior diâmetro denominadas protuberâncias (**D,E,F**). **C.** Primórdios foliares observados no 20º dia de cultura. **D.** Protuberância formada no 8º dia de cultivo *in vitro*. **E.** Protuberâncias observadas no 10º dia de cultivo mostrando setores meristemáticos (setas) na periferia. **F.** Detalhe de outro plano de corte da Figura **E** evidenciando área de células meristemáticas na periferia da estrutura (seta).

Barras: A, D, E = $50 \text{ }\mu\text{m}$; B, F = $30 \text{ }\mu\text{m}$; C = $100 \text{ }\mu\text{m}$.

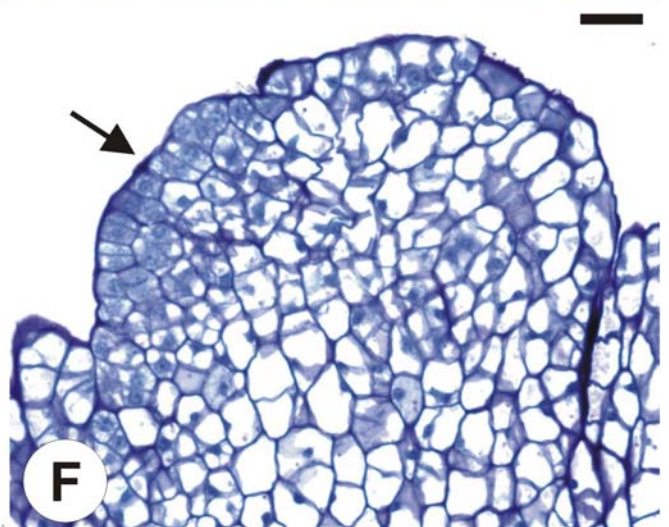
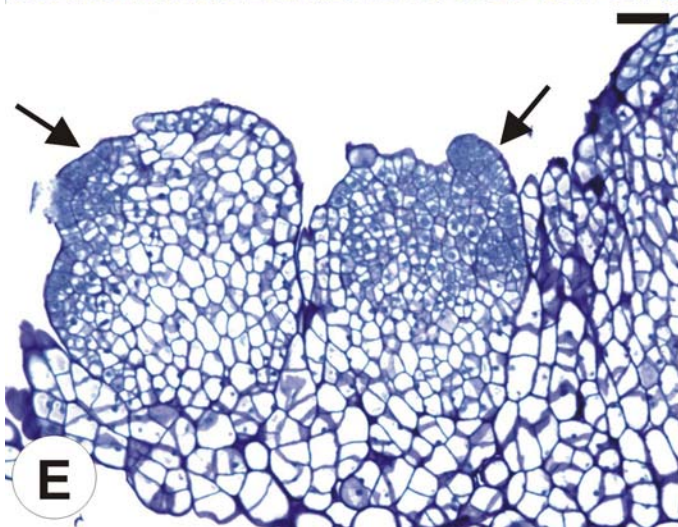
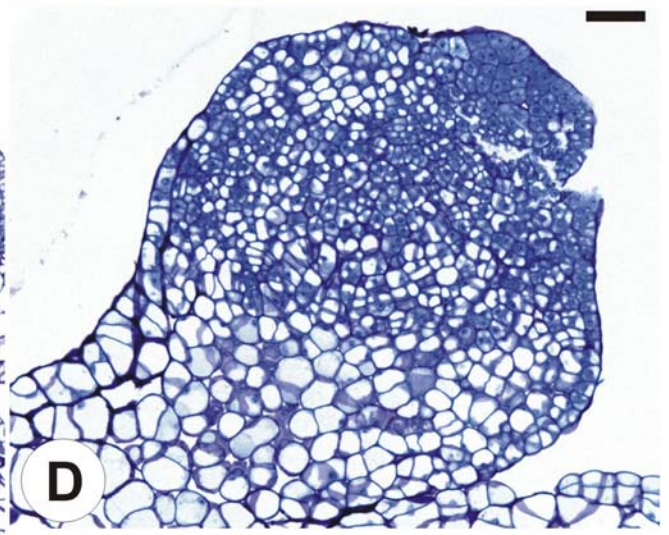
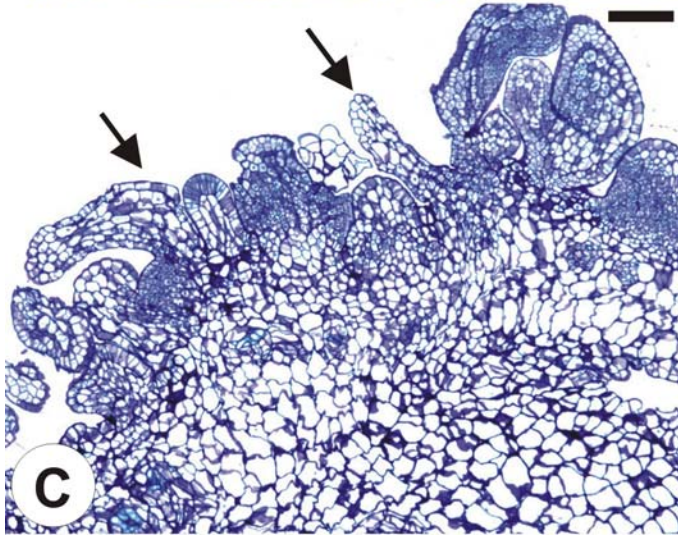
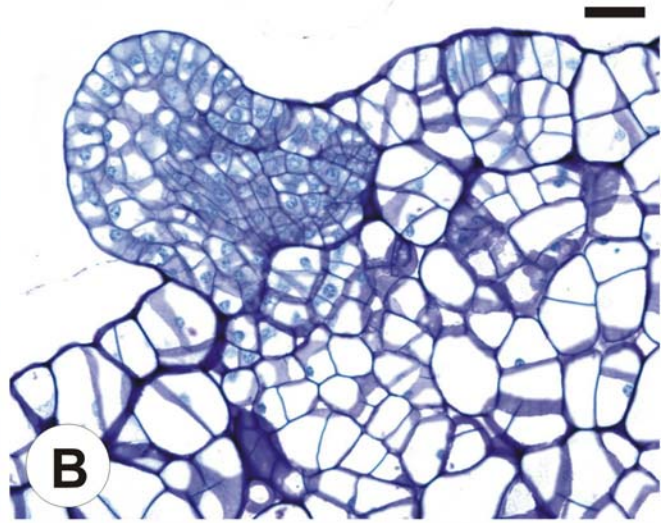
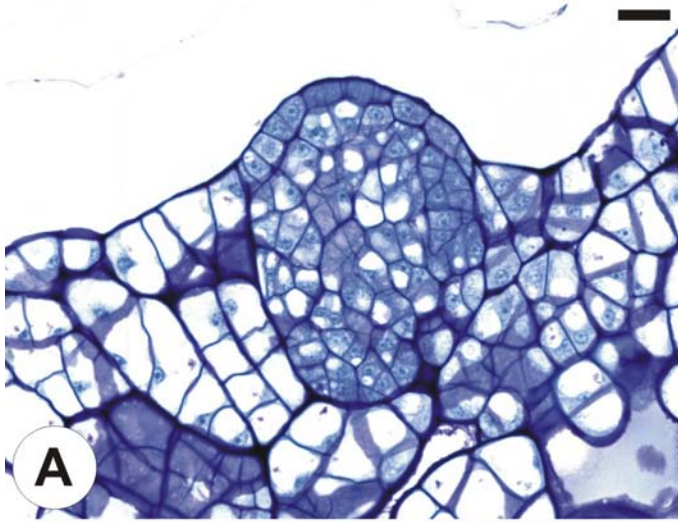


Figura 3. A-C. Elétron-micrografias de explantes hipocotiledonares (Ex) inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e com **(B,C)** ou sem **(A)** adição de 5% de água de coco. **A.** Protuberância (seta) formada diretamente no explante aos 30 dias de cultivo *in vitro*. **B.** Gemas (G) e primórdios foliares (f) formadas diretamente a partir do explante aos 27 dias de cultura. **C.** Gemas (setas) formadas na superfície da protuberância após 19 dias em meio de cultura.

Barras: A = $30 \text{ }\mu\text{m}$; B, C = $100 \text{ }\mu\text{m}$.

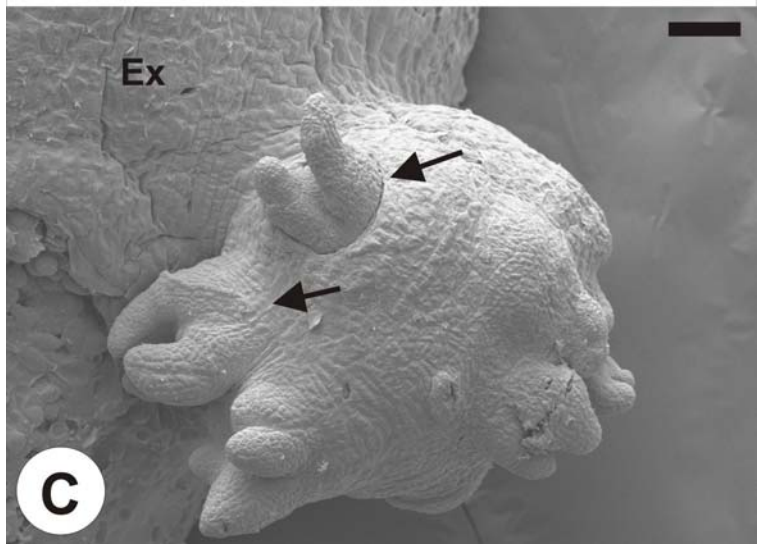
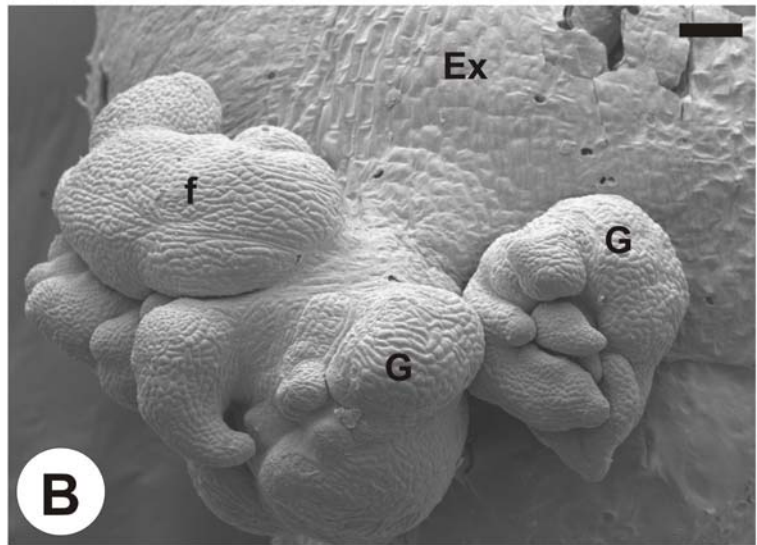
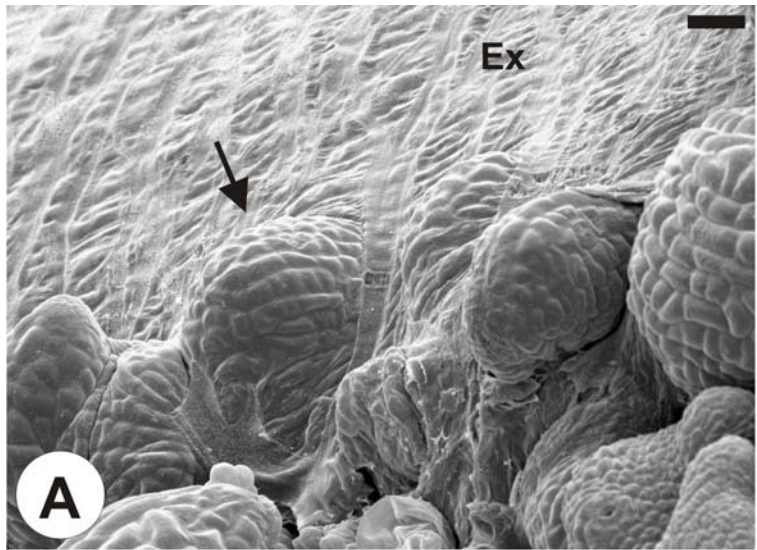


Figura 4. A-F. Cortes longitudinais de protuberâncias formadas diretamente nos explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco. **A.** Aspecto geral de uma protuberância aos 19 dias de cultivo. **B.** Detalhe da protuberância documentada em **A**, evidenciando as células meristemáticas (seta) formadas nas camadas periféricas dessa estrutura. **C-E.** Protuberâncias aos 43 dias em cultura. Em **D** a seta indica a vascularização no centro da protuberância. **E.** Gema (seta) formada na periferia da protuberância. **F.** Protuberância aos 26 dias de cultivo *in vitro*. Observe os primórdios foliares (ponta de setas), a formação de uma gema na periferia da estrutura (seta maior), bem como a diferenciação de elementos traqueais (setas menores) na região central da estrutura.

Barras: A = 100 µm; B = 50 µm; C = 199 µm; D, E, F = 74 µm.

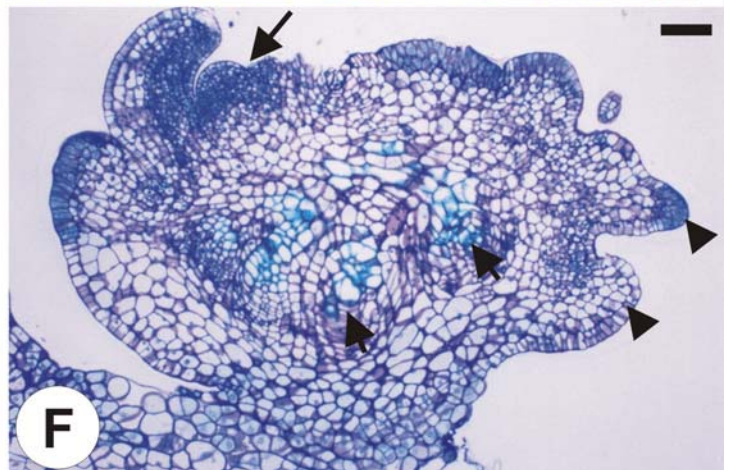
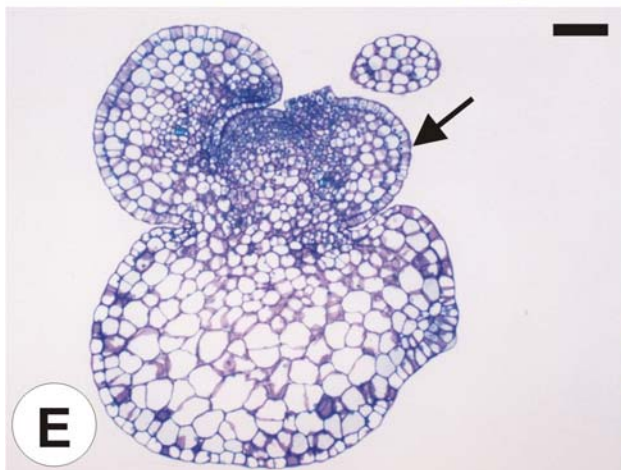
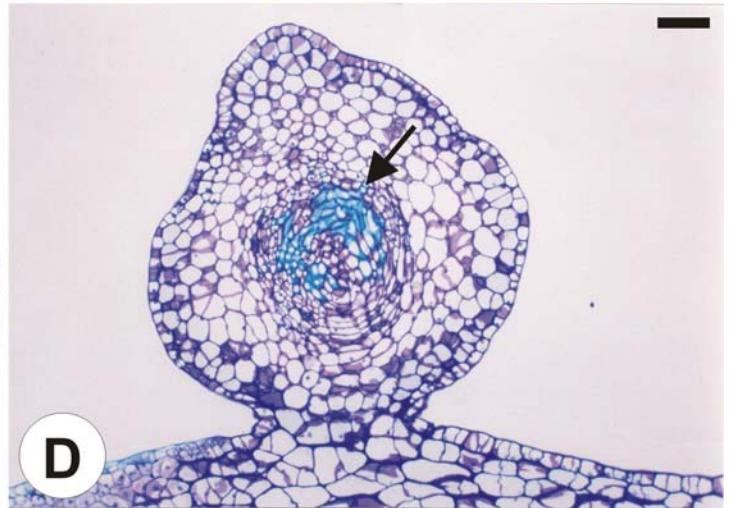
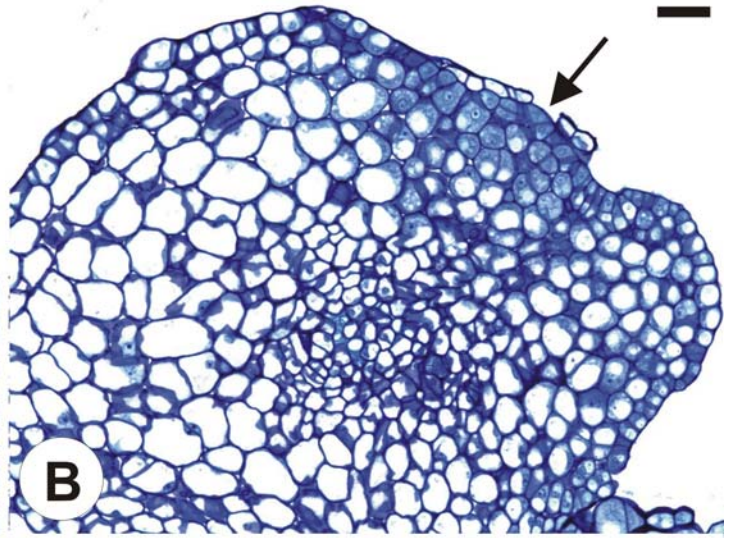
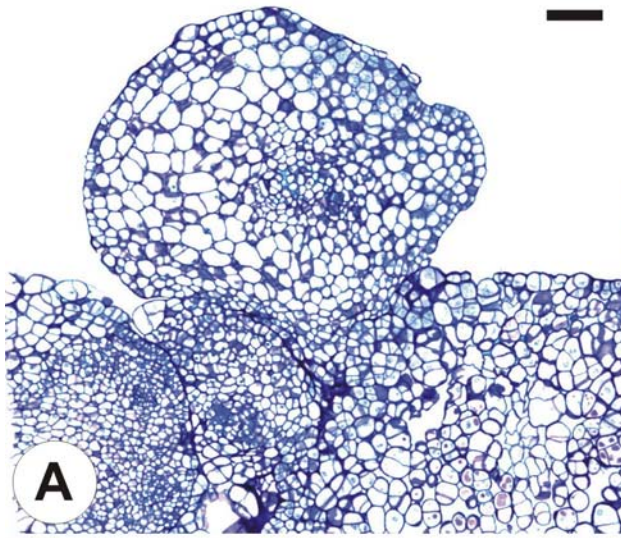


Figura 5. A-F. Segmentos de hipocótilo inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco evidenciando a assincronia do processo organogênico. **A.** A seta indica uma gema aos 13 dias de cultura. **B.** Gema (G) e estrutura foliar (f) originando-se diretamente do explante, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. **C-F.** Explantes hipocotiledonares aos 48 dias de cultivo *in vitro*. **C.** Protuberâncias (setas) e gema (G) formadas diretamente no explante. **D.** Corte longitudinal de protuberâncias similares àquelas observadas em **C**. Essas estruturas globulares originam-se de camadas epidérmica e subepidérmicas do explante, caracterizando sua origem superficial. **E.** Gema formada a partir da protuberância. **F.** Corte longitudinal da gema mostrada em **E** confirmando a origem da estrutura na periferia da protuberância (Pr).

Barras: A, B, E = 410 µm; C = 450 µm; D, F = 199 µm.

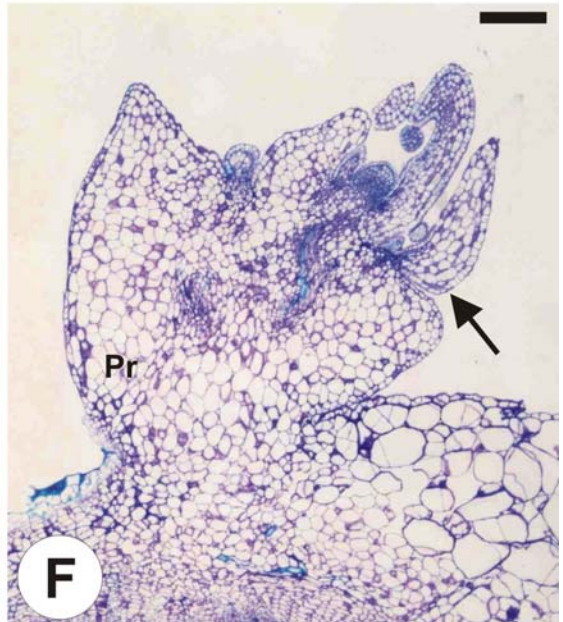
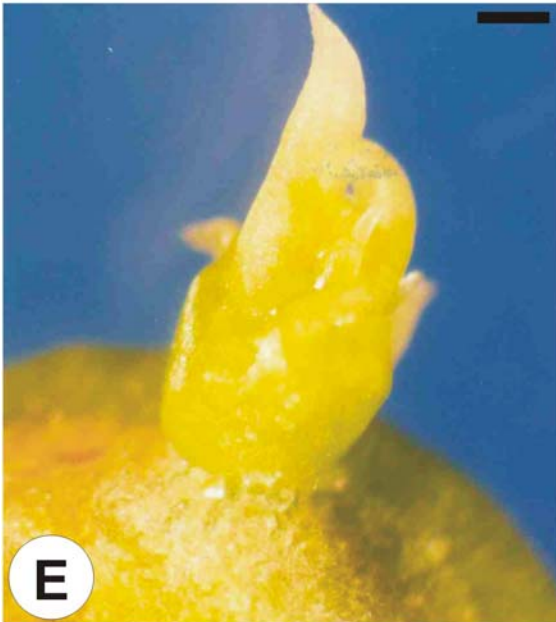
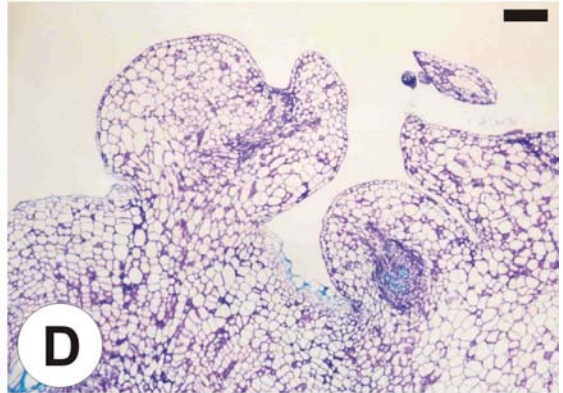
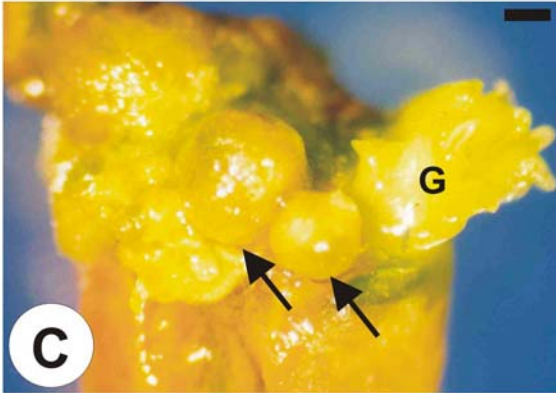
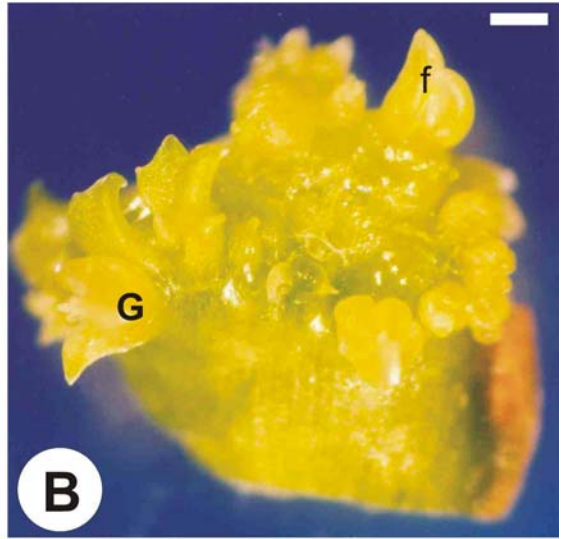
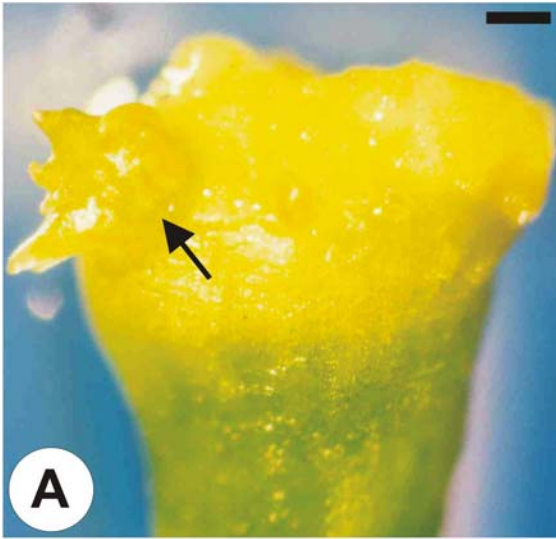


Figura 6. Explante hipocotiledonar aos 48 dias (A) e aos 18 dias (B-D) em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Protuberâncias (setas) formadas indiretamente a partir do calo. **B.** Proliferação celular (pc) na extremidade do explante. **C.** Corte longitudinal da amostra documentada em **B.** A seta indica o meristema apical caulinar formado na região proliferada, caracterizando a via organogênica indireta. **D.** Detalhe do meristema apical caulinar indicado em **C** (seta).

Barras: A = $620 \mu\text{m}$; B,C = $410 \mu\text{m}$; D = $74 \mu\text{m}$.

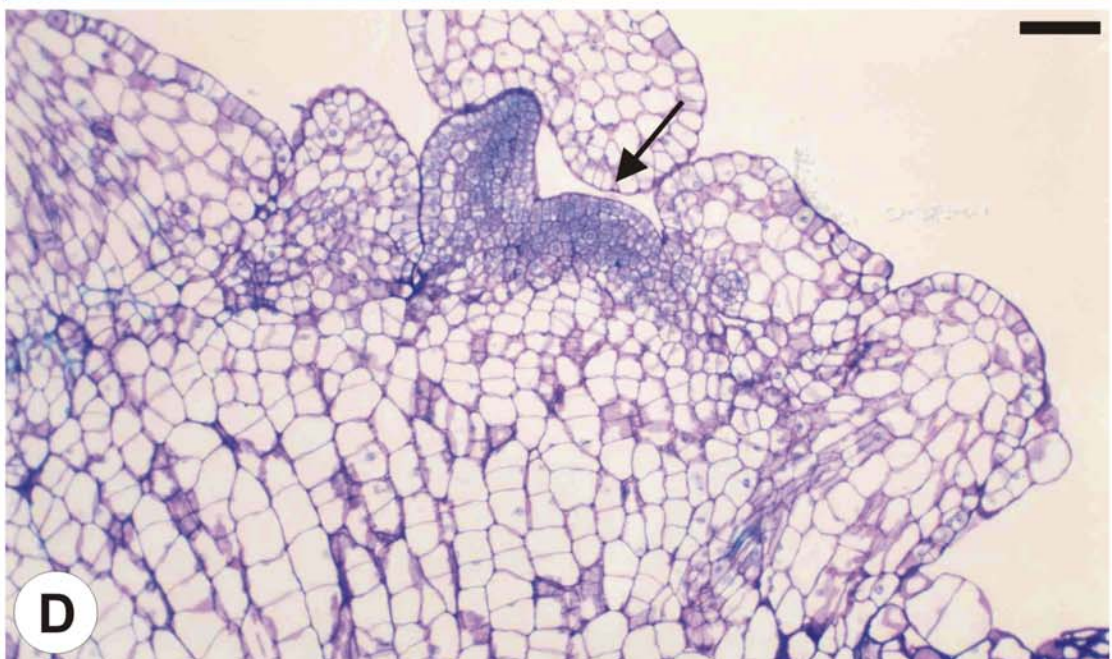
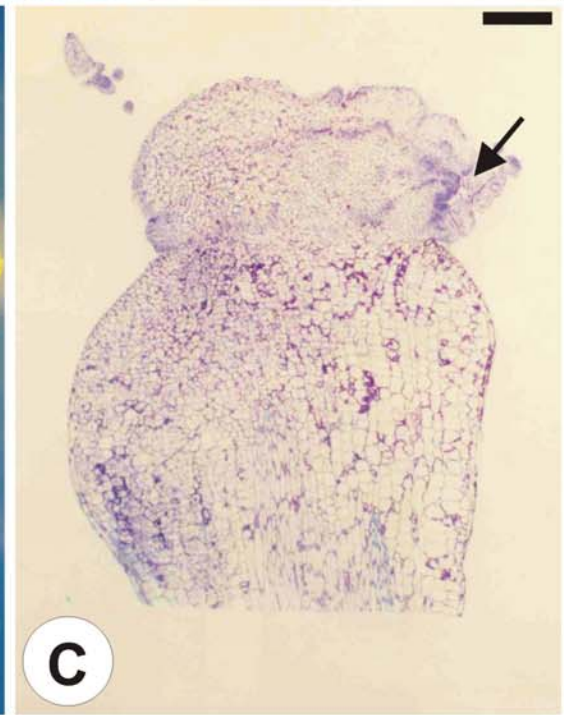
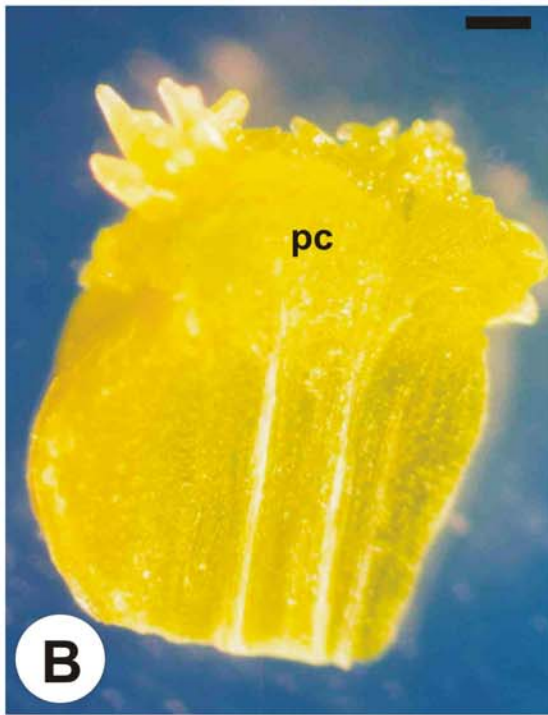
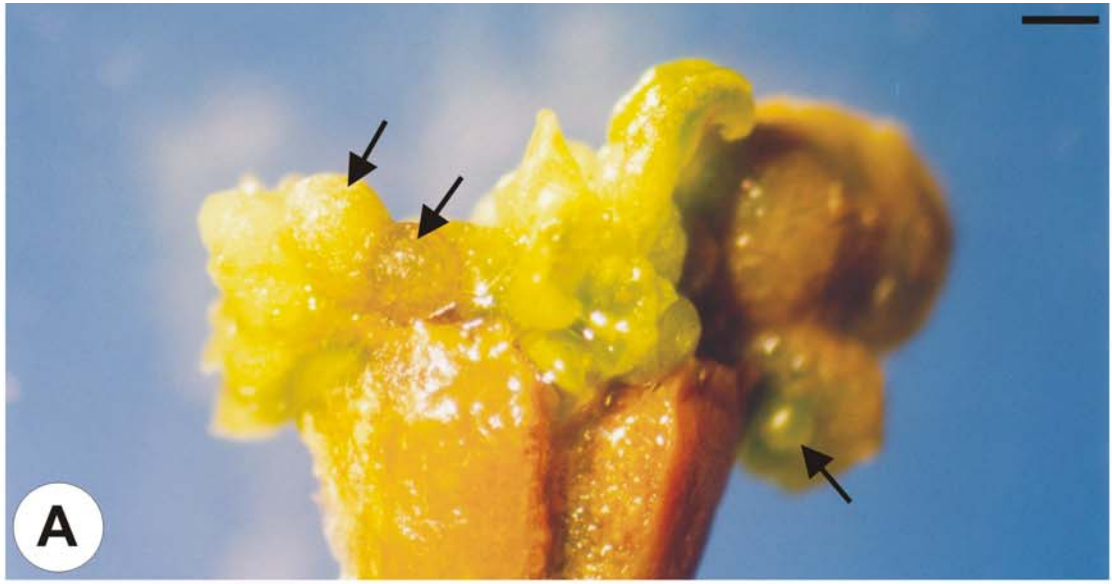


Figura 7. A-D. Elétron-micrografias de explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Explante no 10^o dia de cultivo evidenciando a formação de calo (c) e início do desenvolvimento de estruturas (setas) na periferia do explante. **B.** Detalhe do calo indicado em **A.** **C.** Gemas originadas a partir do calo após 27 dias em meio de cultura. **D.** Detalhe de uma gema formada indiretamente no explante hipocotiledonar.

Barras: A, B = $200 \text{ }\mu\text{m}$; C, D = $100 \text{ }\mu\text{m}$.

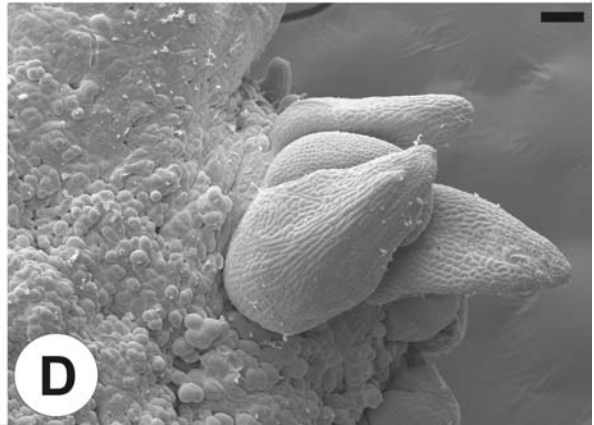
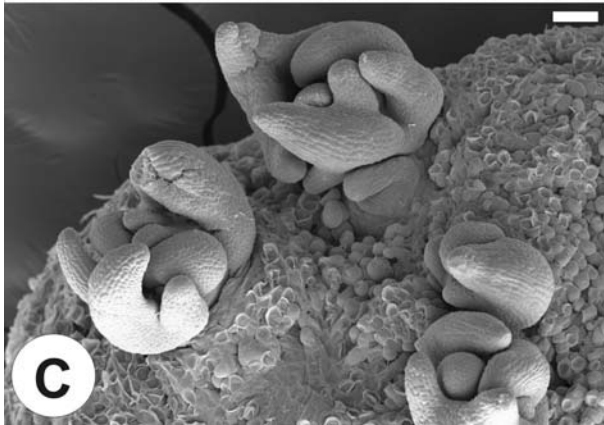
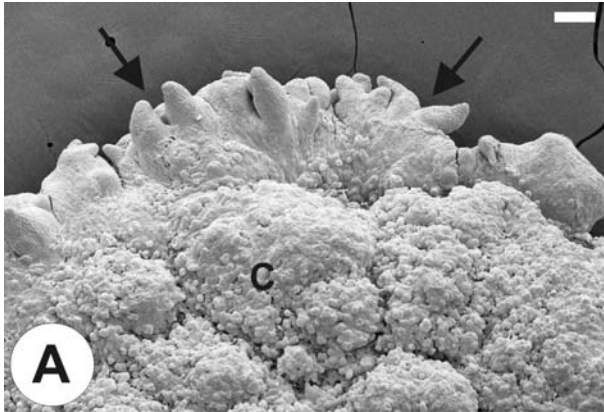


Figura 8. *P. edulis* f. *flavicarpa* – **A-C.** Explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Protuberâncias (pontas de seta) formadas diretamente no explante aos 18 dias de cultivo *in vitro*. **B.** Protuberância (seta menor) envolta por substância péctica. A seta maior indica o desenvolvimento de uma gema na periferia da protuberância aos 26 dias de cultivo *in vitro*. **C-D.** Cortes longitudinais de protuberâncias formadas a partir do explante foliar aos 25 dias em cultura e analisados ao microscópio de fluorescência, evidenciando a natureza péctica (p) da substância encontrada ao redor dessas protuberâncias.

Barras: A = $474 \mu\text{m}$; B = $352 \mu\text{m}$; C = $66,6 \mu\text{m}$; D = $33,3 \mu\text{m}$.

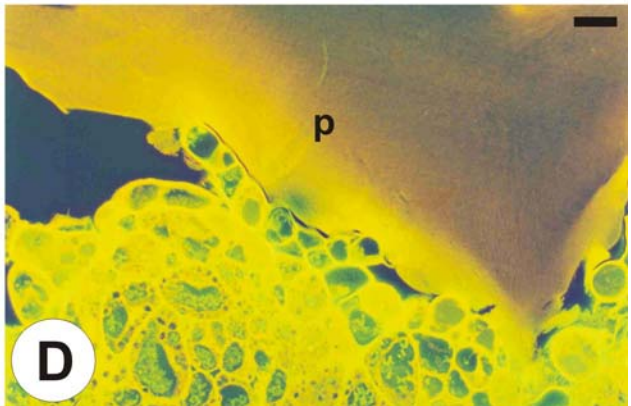
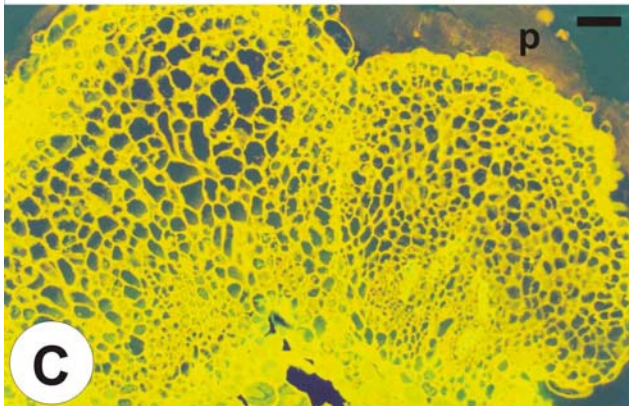
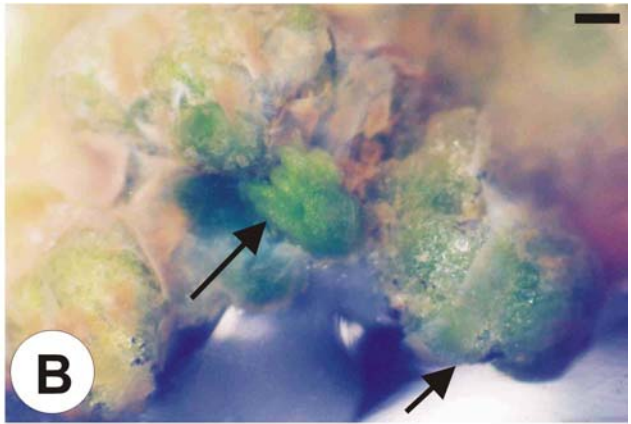
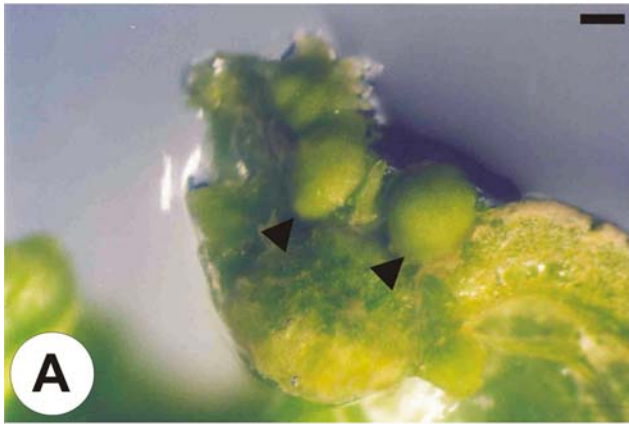


Figura 9. A-B. Elétron-micrografias das protuberâncias formadas diretamente nos explantes hipocotiledonares aos 27 dias em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. Em **A** observa-se uma protuberância envolta pela matriz extracelular constituída pela pectina (seta). **B.** Substância péctica envolvendo a protuberância (seta) e o primórdio foliar (f). **C-H.** Elétron-micrografias das células das protuberâncias formadas a partir do explante hipocotiledonar aos 25 dias de cultura. **C-F.** Matriz extracelular (p) envolvendo as células periféricas das protuberâncias. **G-H.** Aspecto geral das células centrais das protuberâncias. Observe os plastídios (setas menores) contendo amido localizados próximos à parede celular e o acúmulo de proteína (setas maiores) no vacúolo.

Barras: A = $200 \mu\text{m}$; B = $100 \mu\text{m}$; C = $4,08 \mu\text{m}$; D, F = $0,23 \mu\text{m}$; E = $0,17 \mu\text{m}$; G = $4,08 \mu\text{m}$; H = $1,73 \mu\text{m}$.

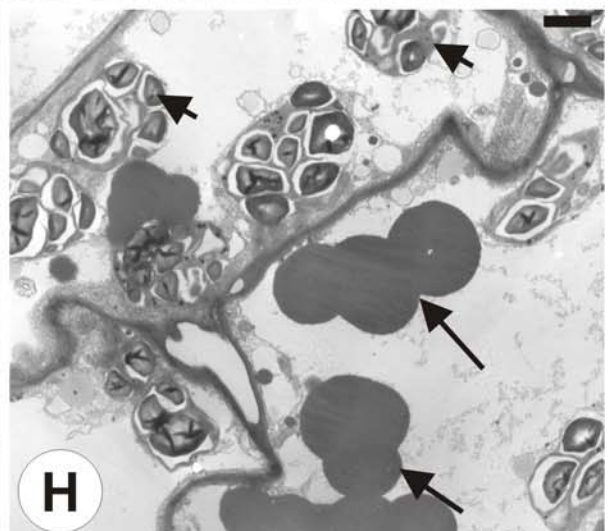
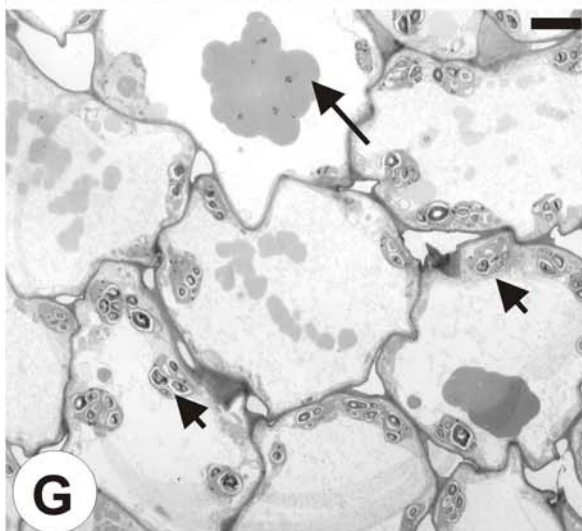
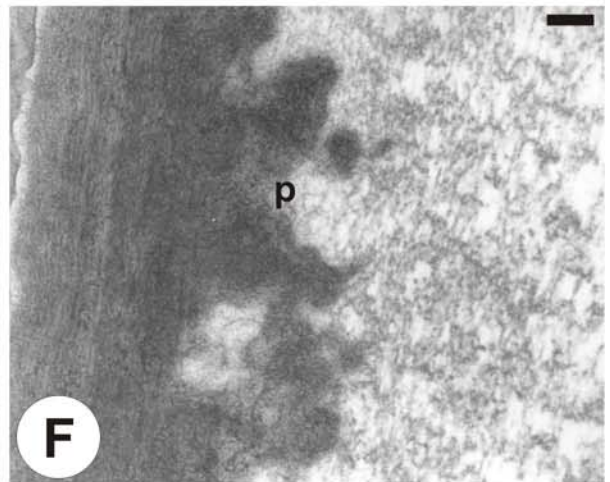
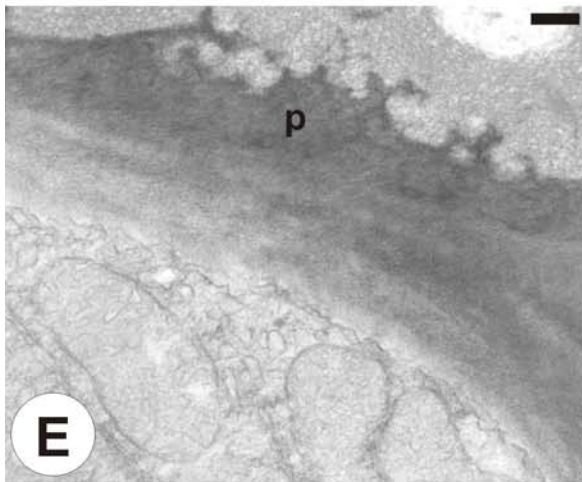
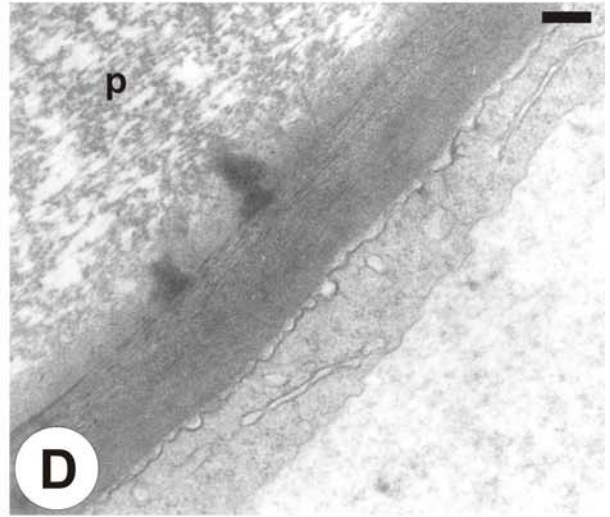
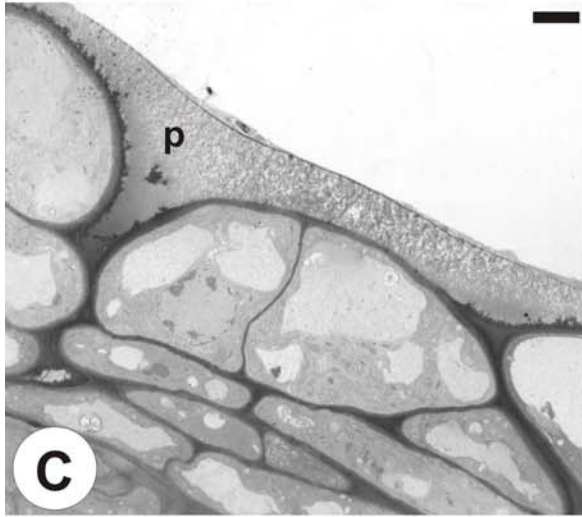
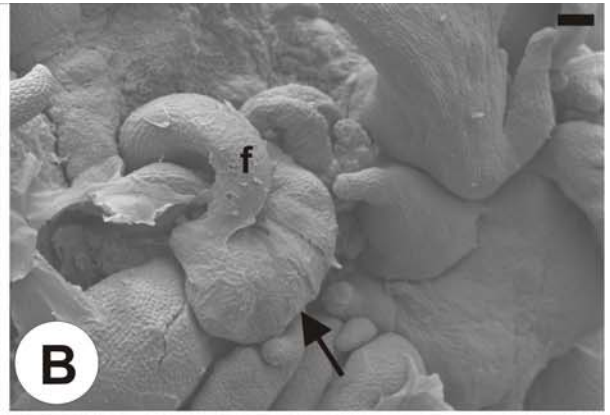
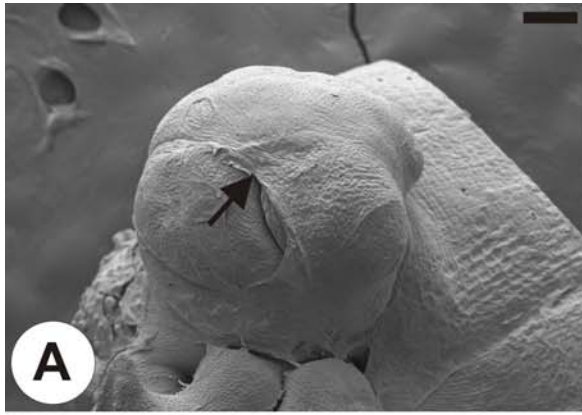


Figura 10. A-B. Cortes longitudinais da região central de protuberâncias originadas no explante hipocotiledonar inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Elementos traqueais (seta) entre as células centrais das protuberâncias. **B.** Elementos traqueais (seta) formados a partir de divisões das células centrais. **C-F.** Elétron-micrografias das células centrais das protuberâncias mostrando elementos traqueais (Et) em diferenciação e outros já diferenciados.

Barras: A,B = $10 \text{ }\mu\text{m}$; C = $5,5 \text{ }\mu\text{m}$; D = $1,02 \text{ }\mu\text{m}$; E = $7,4 \text{ }\mu\text{m}$; F = $1,7 \text{ }\mu\text{m}$.

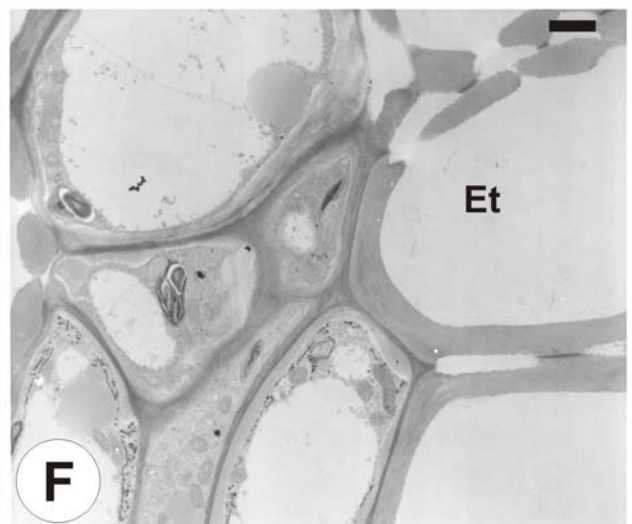
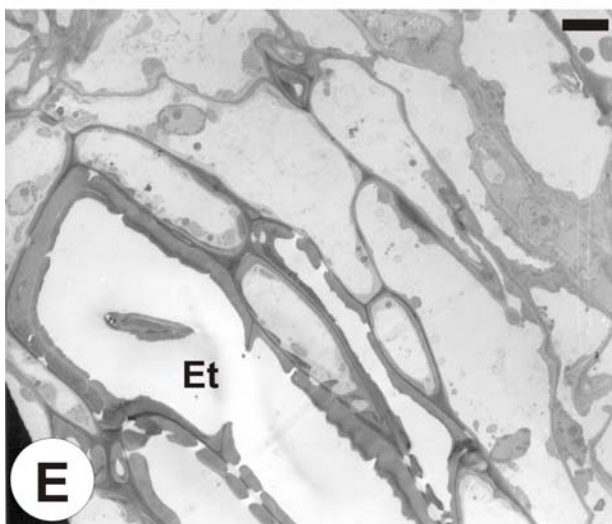
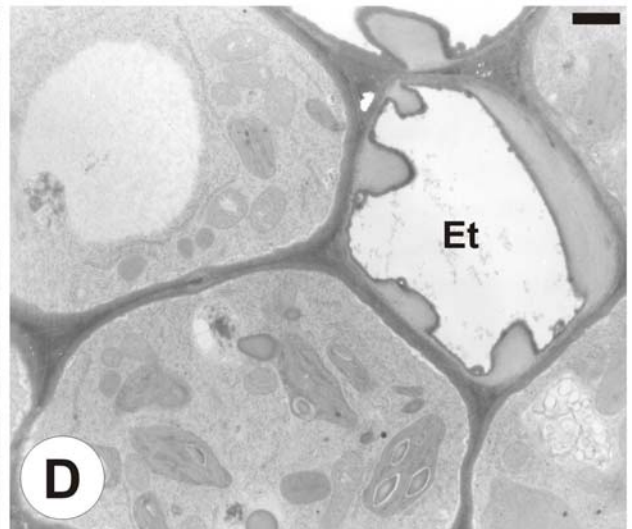
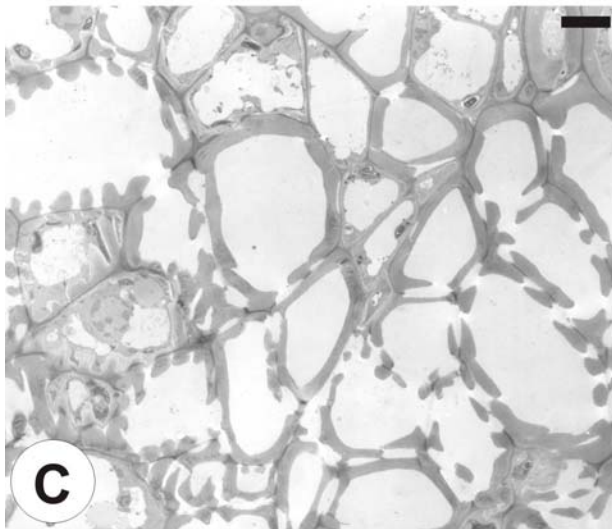
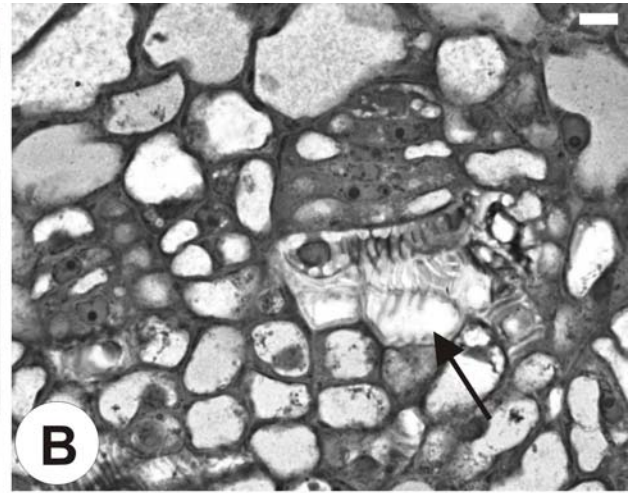
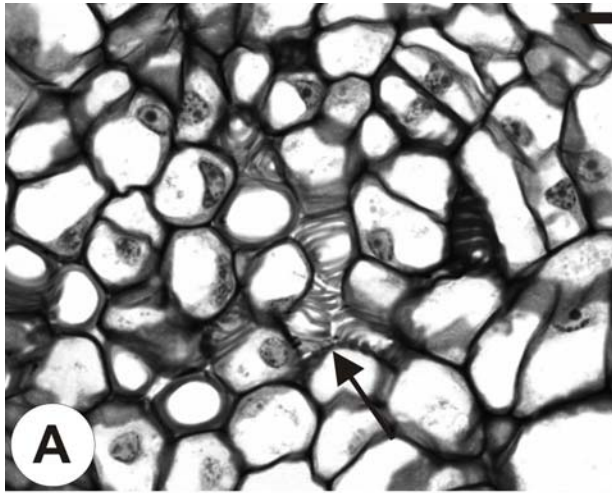


Figura 11. Elétron-micrografias das células centrais da protuberância em processo de diferenciação vascular (**A, C-G**) ou não (**B**) submetidas à técnica do ZIO. **A.** Plastídio alongado (seta) localizado próximo à parede celular no elemento traqueal em diferenciação. **B.** Célula parenquimática cujo plastídio (seta) não é alongado como na célula em diferenciação vascular. **C-D.** As setas indicam as membranas dos dictiossomos com diferentes intensidades de impregnação pelo zinco. **E.** Retículo endoplasmático (Re) e dictiossomo (seta). **F.** Retículo endoplasmático liso (Rel) localizado próximo à parede celular. **G.** Gota lipídica (L) envolta por retículo endoplasmático liso.

Barras: A = 0,31 μm ; B, D, E, G = 0,17 μm ; C = 0,23 μm ; F = 0,43 μm .

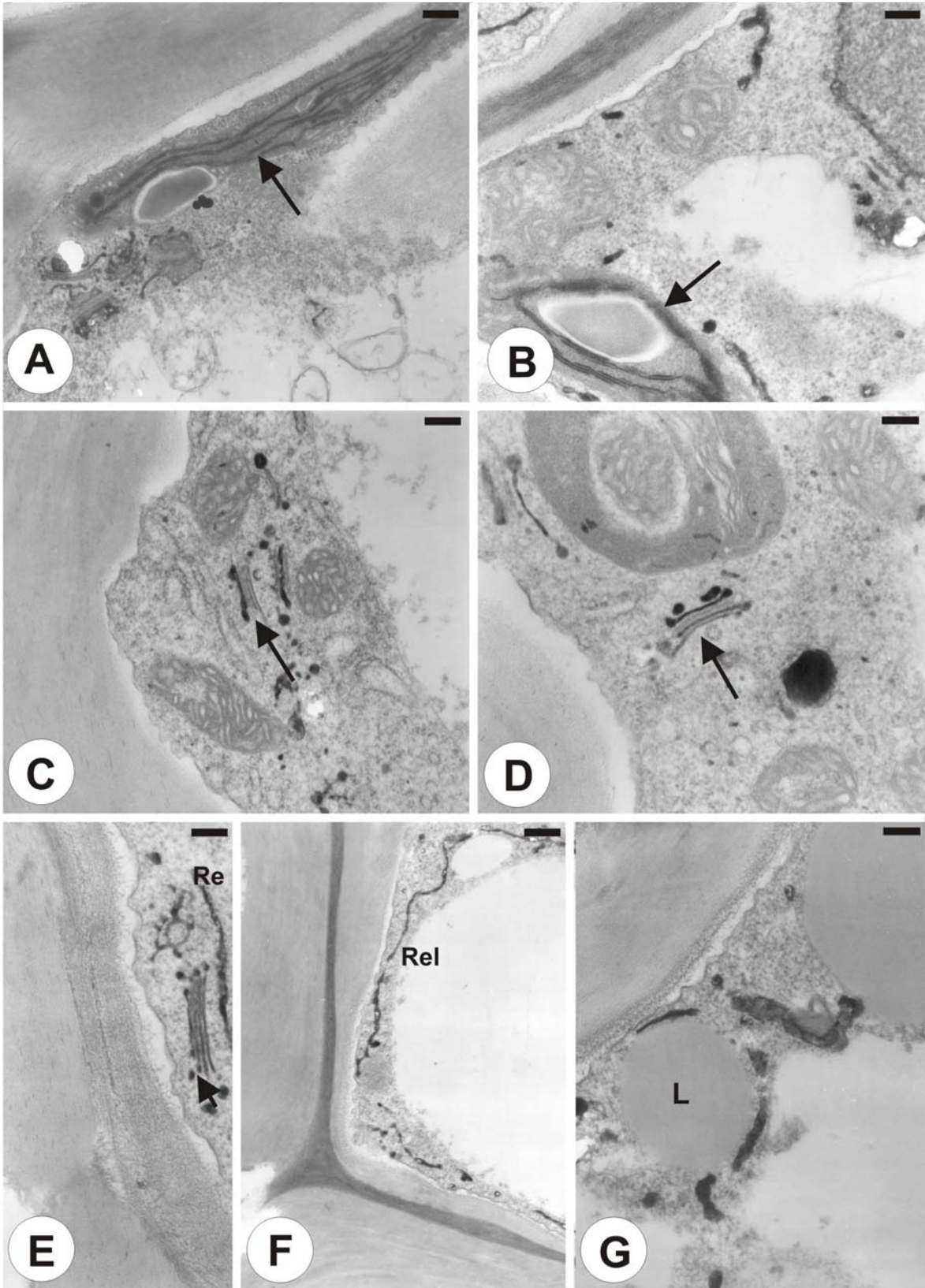


Figura 12. A-C. Elétron-micrografias das células centrais das protuberâncias apresentando vacúolo autofágico (seta) e plastídio (seta menor). **C.** Envoltório nuclear (seta) íntegro contrastado pela técnica do ZIO.

Barras: A, B = 0,23 μm ; C = 0,58 μm .

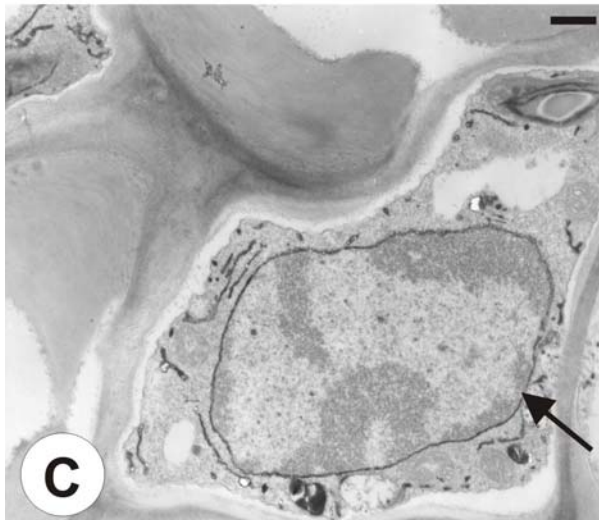
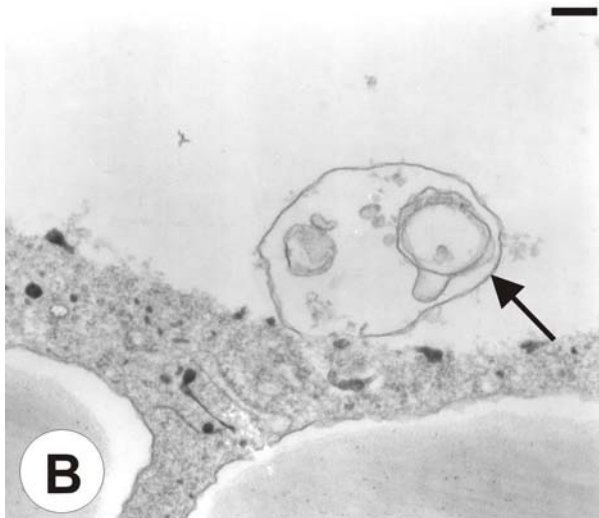
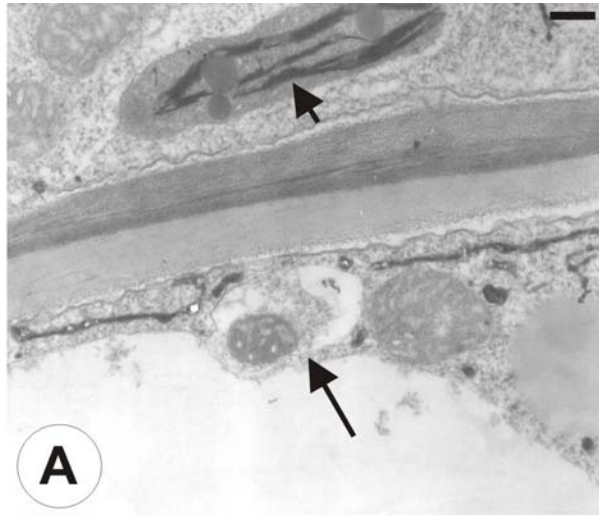


Figura 13. A-D. Elétron-micrografias das células periféricas das protuberâncias formadas diretamente a partir do explante hipocotiledonar. **A.** Aspecto geral das células periféricas. **B.** Detalhe das células recém divididas (setas), apresentando plastídios e vacúolos com conteúdo protéico. **C.** Plasmodesmos na parede celular das células recém divididas (seta) e retículo endoplasmático rugoso (pontas de seta) nas proximidades da parede. **D.** Retículo endoplasmático rugoso (RER) e dictiossomos (d).

Barras: A = 4,08 μm ; B = 1,73 μm ; C = 0,23 μm ; D = 0,23 μm .

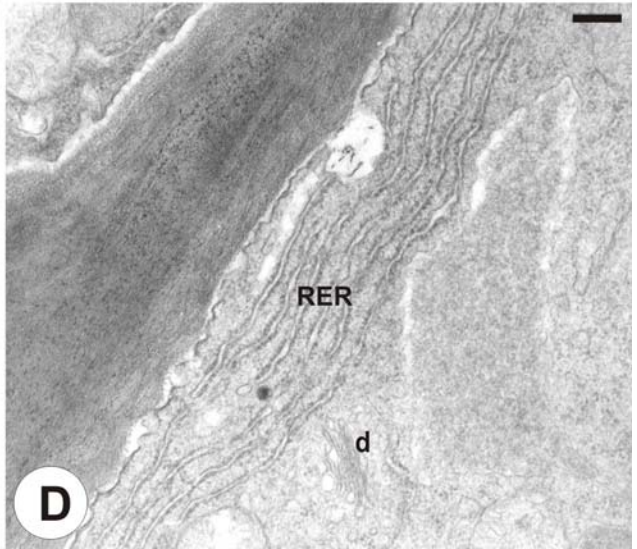
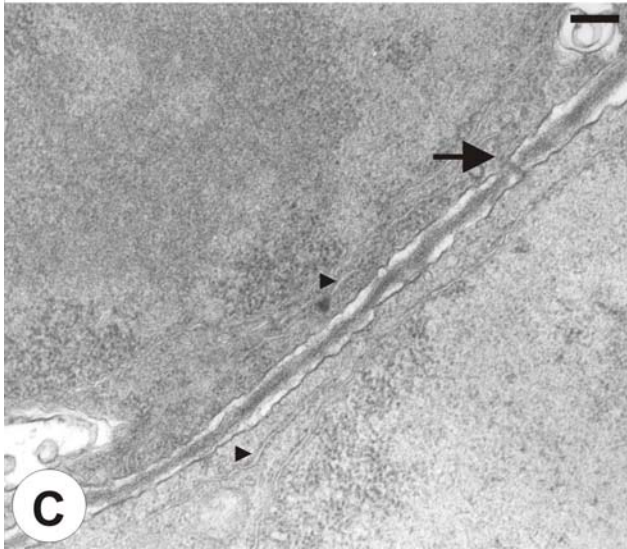
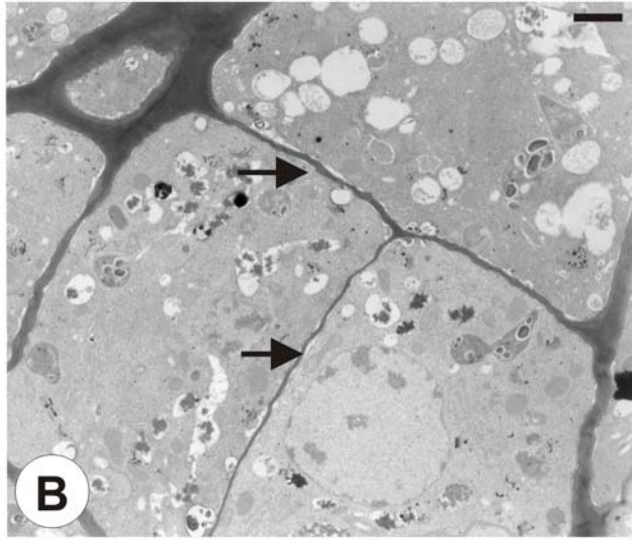
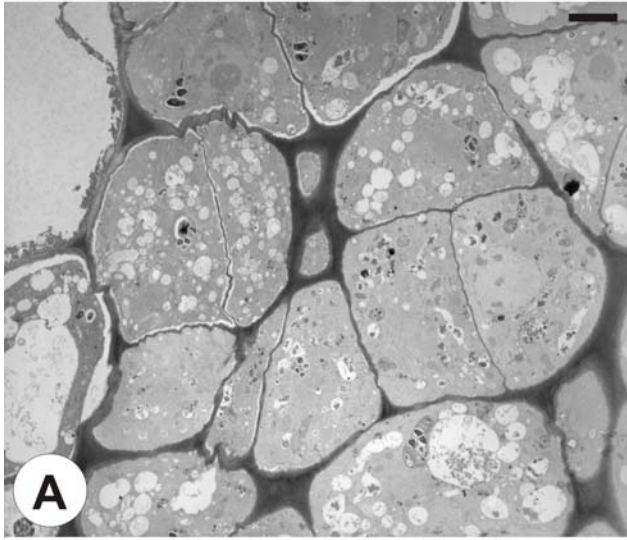


Figura 14. A-B. Elétron-micrografias de mitocôndrias (m), dictiosomos (d) e retículo endoplasmático rugoso (RER) encontradas nas células periféricas das protuberâncias formadas diretamente a partir do explante hipocotiledonar.

Barras: A, B = 0,23 μm .

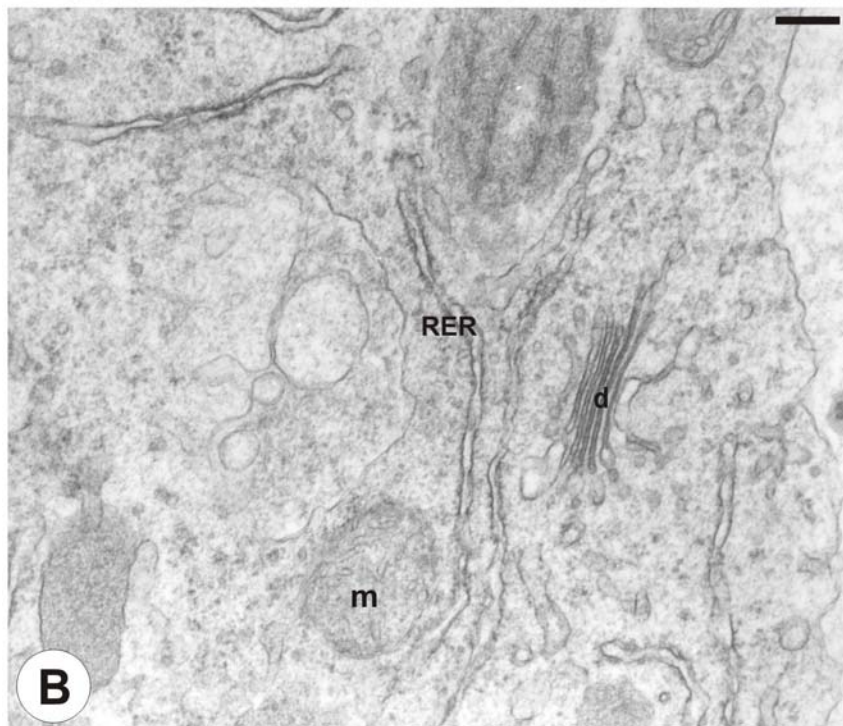
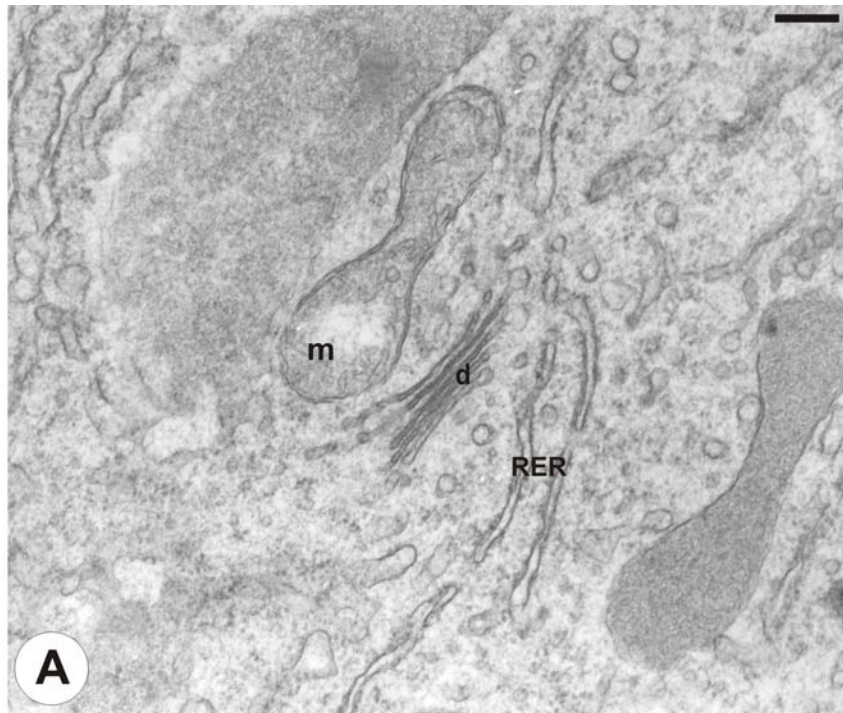


Figura 15. A-E. Elétron-micrografias dos dictiossomos (d), contrastados pela técnica do ZIO, em fase ativa de secreção, encontrados nas células periféricas das protuberâncias dos explantes foliares (**A-D**) e hipocotiledonar (**E**). **A-B.** Dictiossomos (d) localizados próximos à membrana dos plastídios. Em **B**, verifica-se uma vesícula (seta) sendo incorporada ao vacúolo (v). Em **C**, os dictiossomos (d) localizam-se nas adjacências da membrana plasmática. **D.** Detalhe de um dictiossomo (d) com todas as membranas em atividade. **E.** A região do dictiossomo indicada pela seta não se apresenta contrastada pela presente técnica.

Barras: A = 0,17 μm ; B = 0,12 μm ; C = 0,17 μm ; D-E = 0,12 μm .

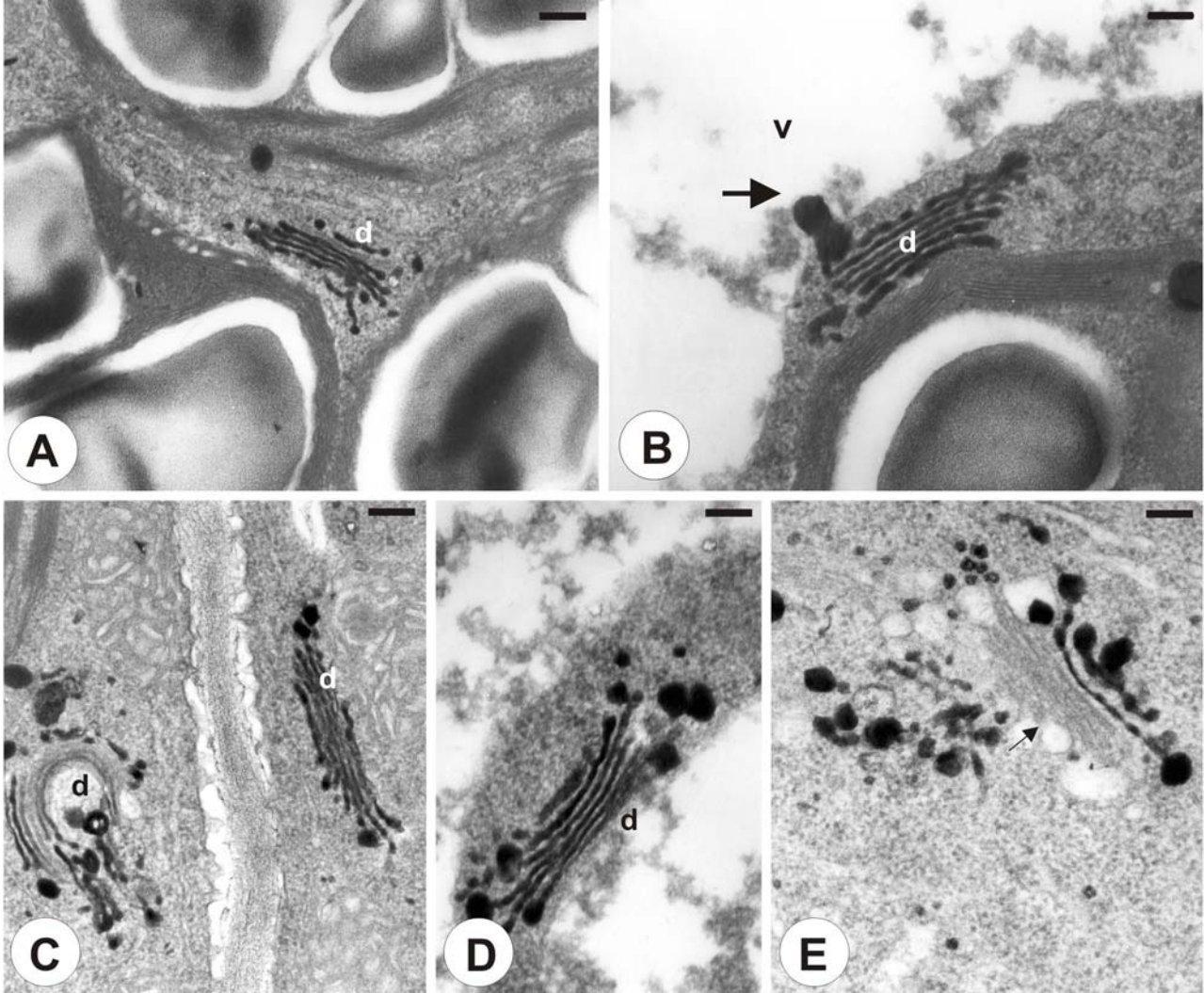


Figura 16. A-D. Elétron-micrografias de células periféricas das protuberâncias formadas indiretamente a partir do explante hipocotiledonar. **A.** Acúmulo de proteína no vacúolo (v). **B.** Plastídios contendo um ou mais grãos de amido. Observe as numerosas mitocôndrias (m) nas proximidades do núcleo (N). **C.** Núcleo com nucléolo (nc) proeminente. As mitocôndrias (m) e o retículo endoplasmático rugoso (RER) encontram-se nas proximidades do envoltório nuclear. **D.** Retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias (m) e dictiossomos (d).

Barras: A = 7,54 μm ; B = 1,29 μm ; C = 0,58 μm ; D = 0,23 μm .

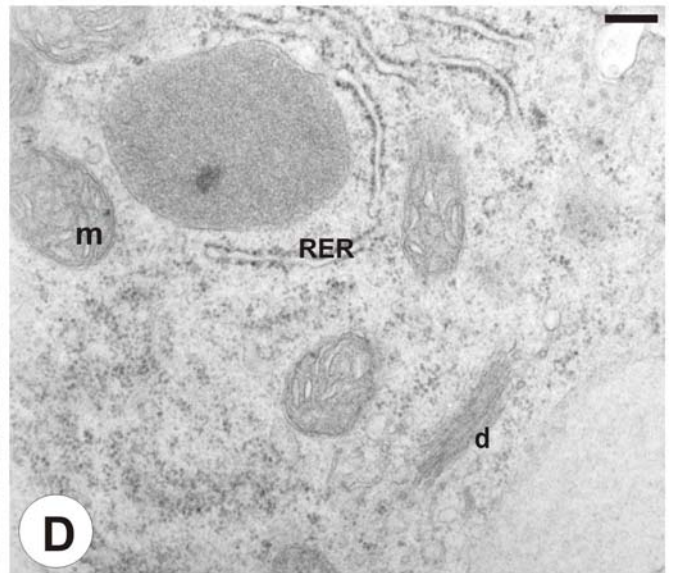
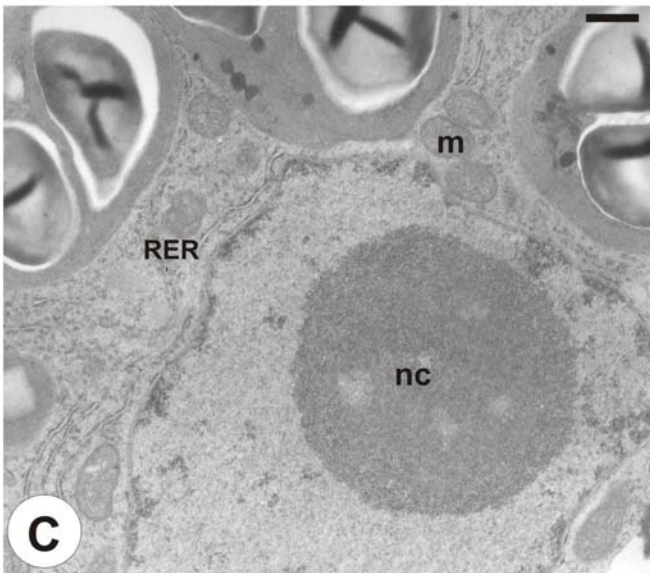
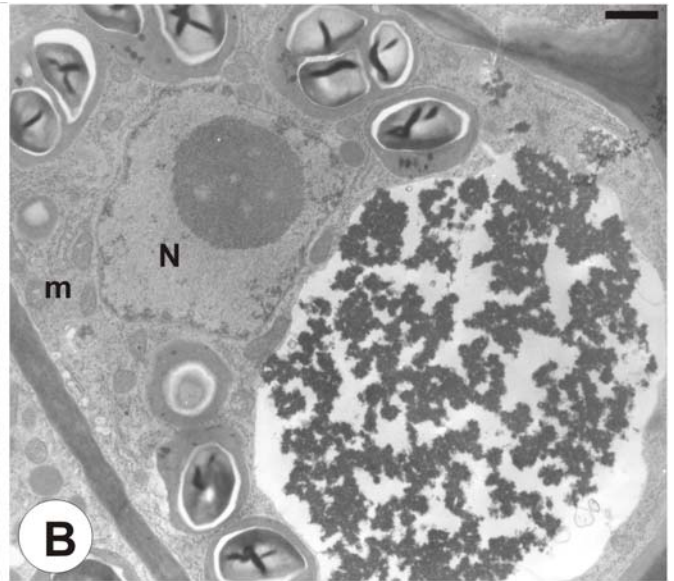
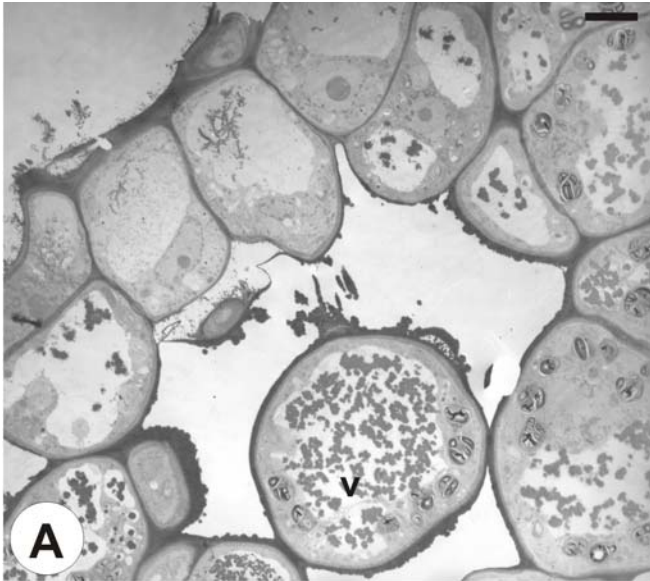


Figura 17. A-D. Elétron-micrografias de células da protuberância. **A.** Núcleo de uma célula periférica da protuberância formada diretamente no explante hipocotiledonar. Observe que o núcleo é esférico e não apresenta qualquer tipo de invaginação. **B.** Aspecto geral das células das protuberâncias formadas via organogênese indireta. A seta indica o início da invaginação do envoltório nuclear. **C-D.** Detalhes da invaginação mostrada em **B**.

Barras: A = 0,43 μm ; B = 7,54 μm ; C = 1,73 μm ; D = 0,31 μm .

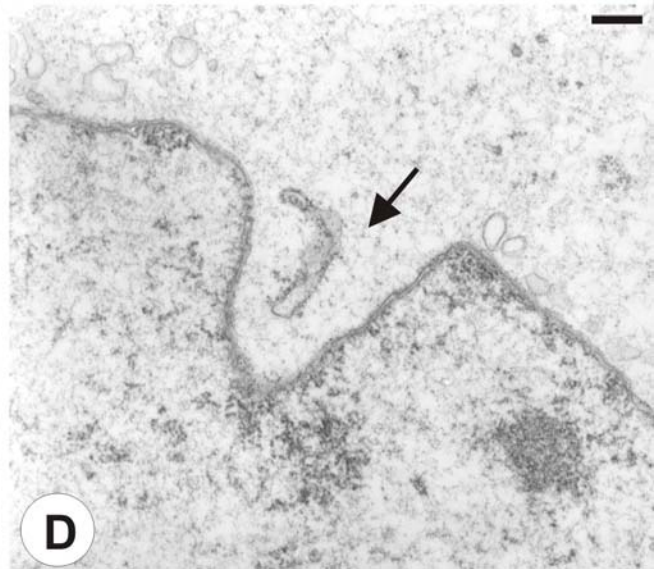
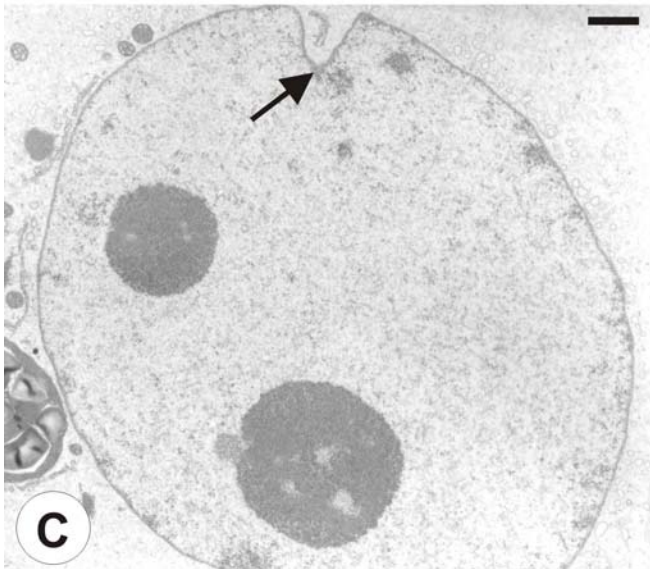
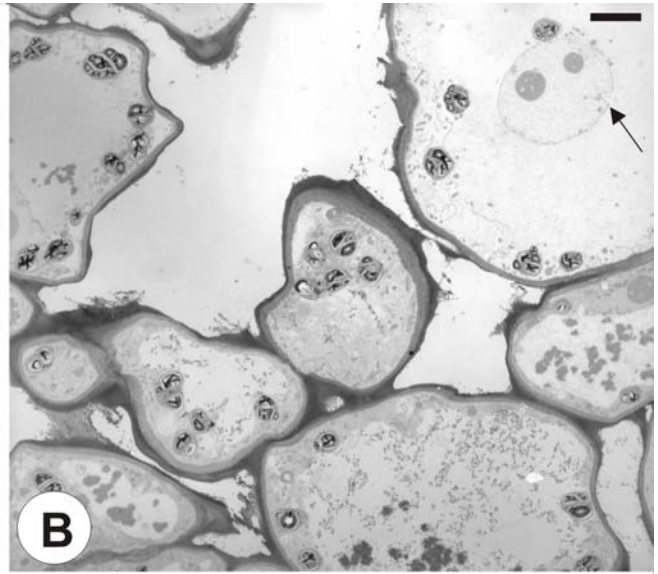
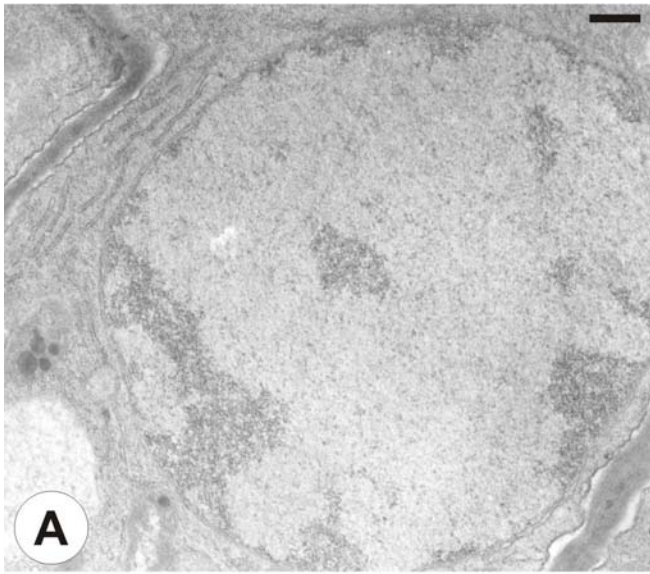


Figura 18. A-D. Elétron-micrografias de células periféricas das protuberâncias formadas indiretamente no explante hipocotiledonar evidenciando o formato irregular do envoltório nuclear. **A.** A seta indica parte do núcleo já fragmentado. **B.** Invaginação formada no envoltório nuclear. **C-D.** Núcleos com formato irregular.

Barras: A = 1,02 μm ; B = 0,31 μm ; C = 0,58 μm ; D = 1,02 μm .

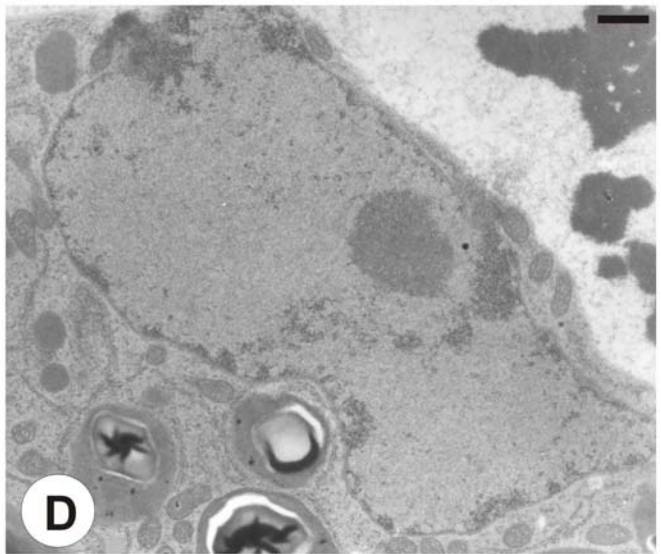
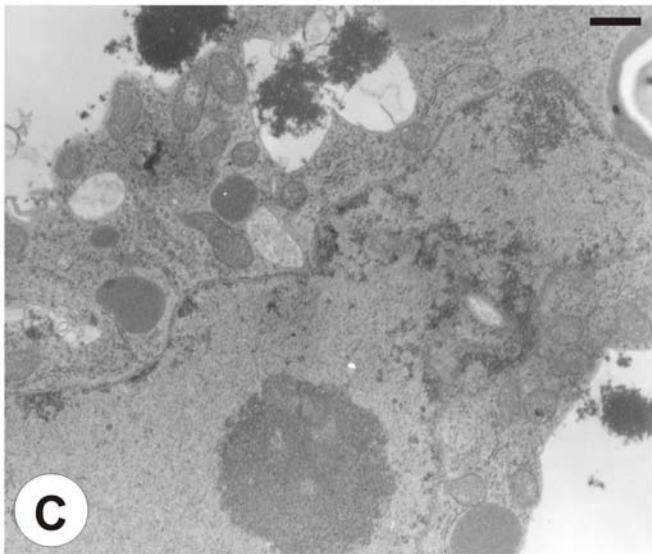
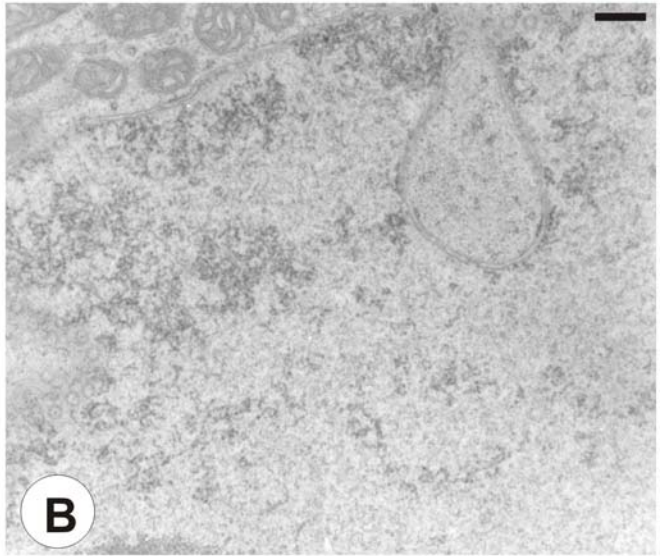
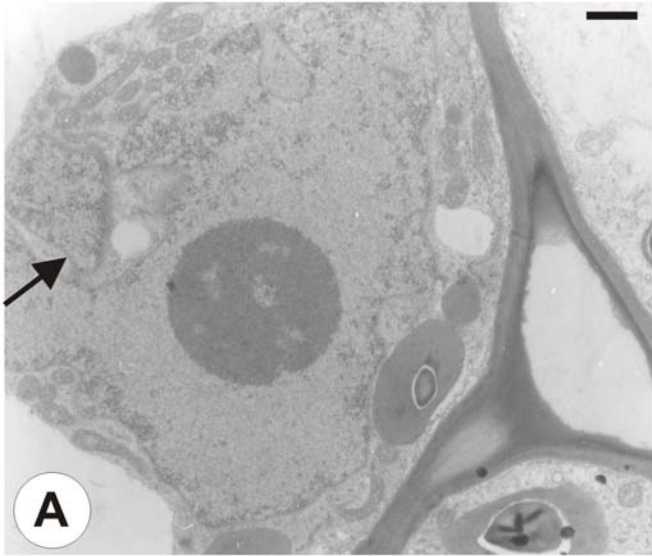


Figura 19. A-D. Núcleos das células periféricas das protuberâncias que se formaram indiretamente nos explantes hipocotiledonares ressaltando a presença dos complexos de poros nucleares. **A.** Mitocôndrias (m) localizadas na região de invaginação do núcleo. **B.** Detalhe da Figura **A.** **C.** Núcleo apresentando mitocôndria no interior da invaginação (seta). **D.** Detalhe de **C**, mostrando o complexo de poros nucleares (seta).

Barras: A = 0,43 μm ; B = 0,23 μm ; C = 1,02 μm ; D = 0,31 μm .

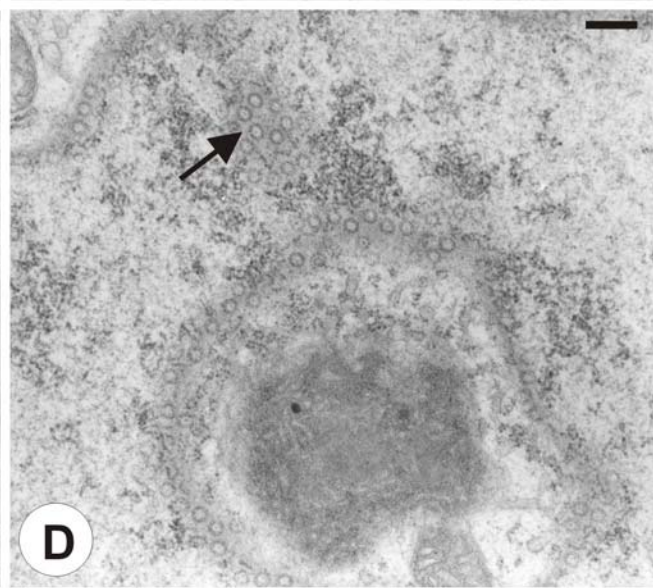
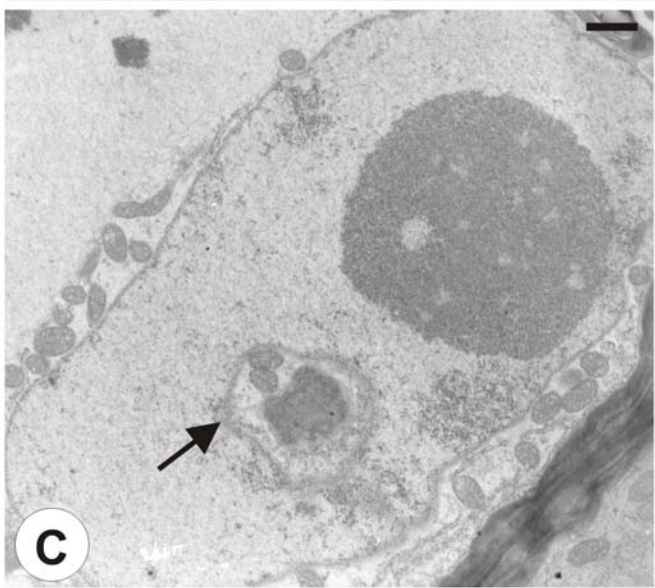
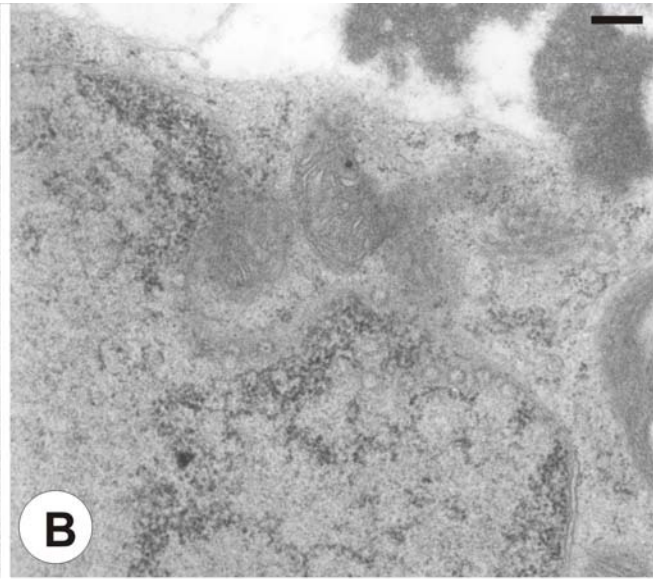
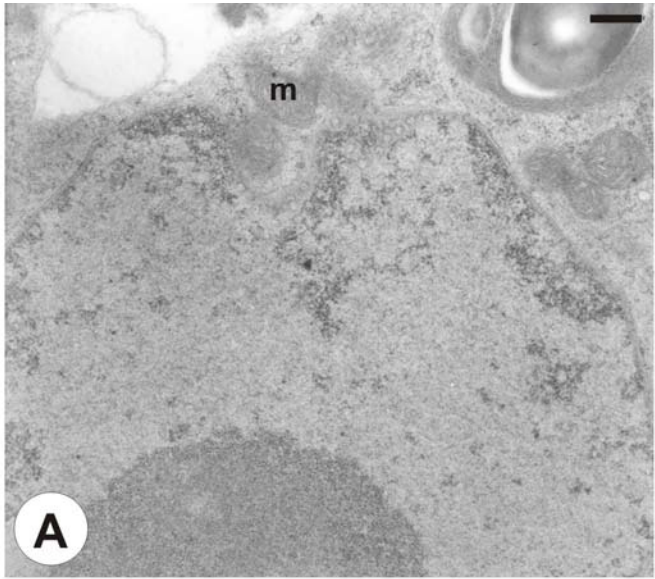


Figura 20. A-D. Elétron-micrografias do núcleo das células periféricas das protuberâncias formadas indiretamente no explante hipocotiledonar. **A.** Núcleo (N) de formato irregular. **B-C.** Complexo de poros nucleares. **D.** Núcleo (N) fragmentado (P = plastídio).

Barras: A = 0,58 μm ; B = 0,23 μm ; C = 0,17 μm ; D = 1,02 μm .

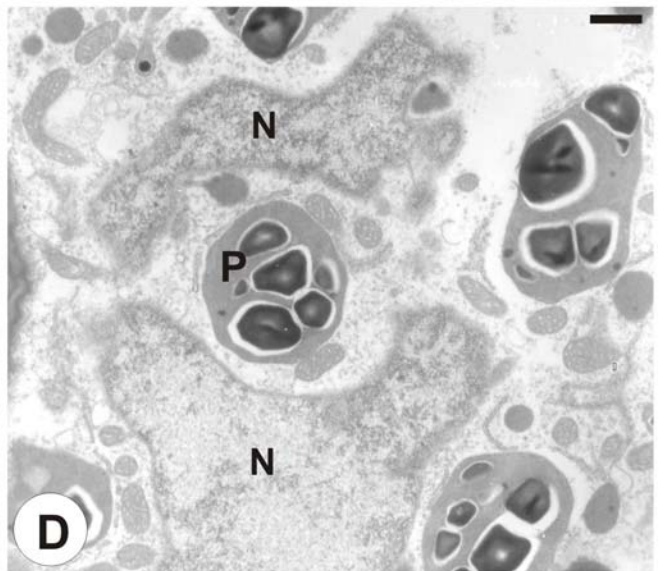
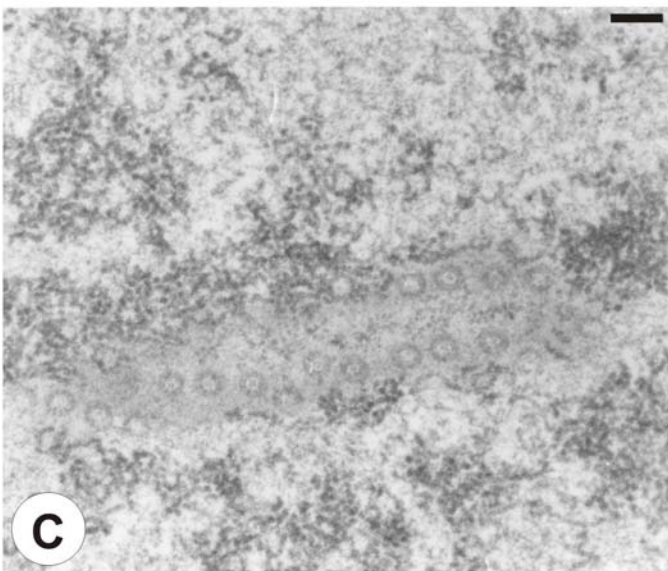
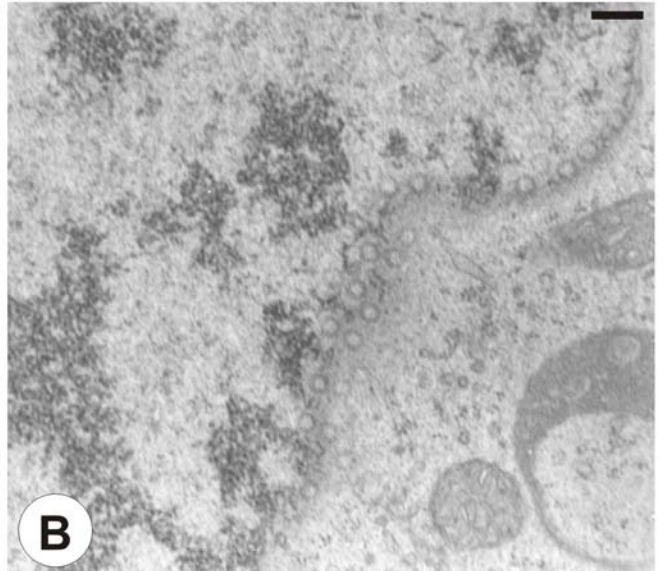
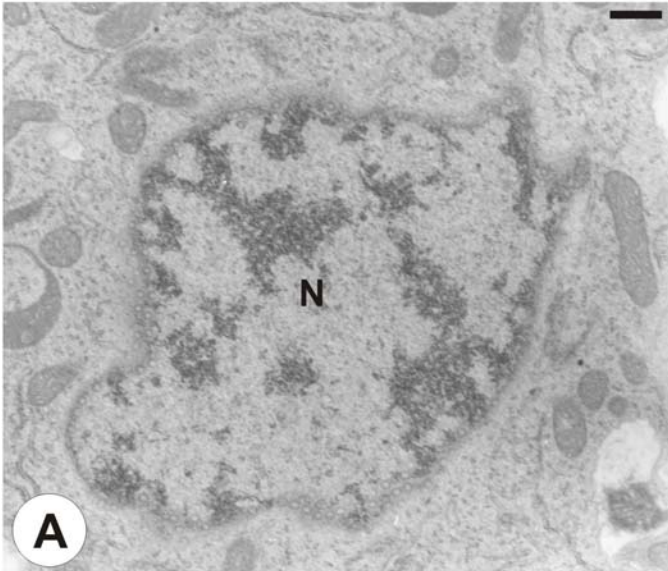


Figura 21. Explante foliar aos 25 dias de cultivo em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco. **A.** Gema (seta) formada na nervura central do explante. **B.** Corte longitudinal da gema (seta) indicada em **A.** **C.** Protuberâncias (seta) formadas na nervura central do explante. **D.** Corte longitudinal das estruturas evidenciadas em **C.** A seta indica um primórdio foliar originando-se na periferia da protuberância. Observe a presença de substância péctica (✦) nas proximidades do primórdio foliar.

Barras: A = 870 µm; B = 199 µm; C = 870 µm; D = 199 µm.

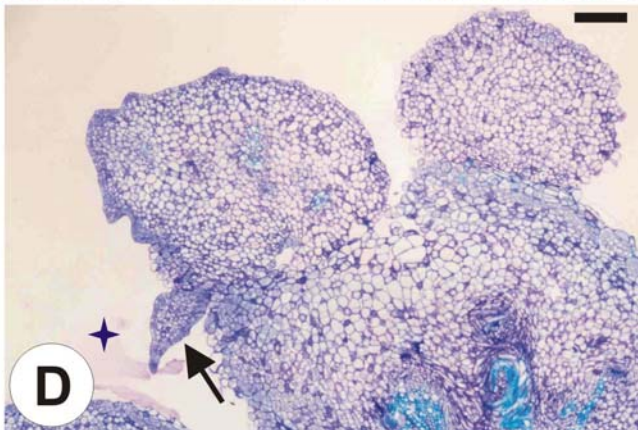
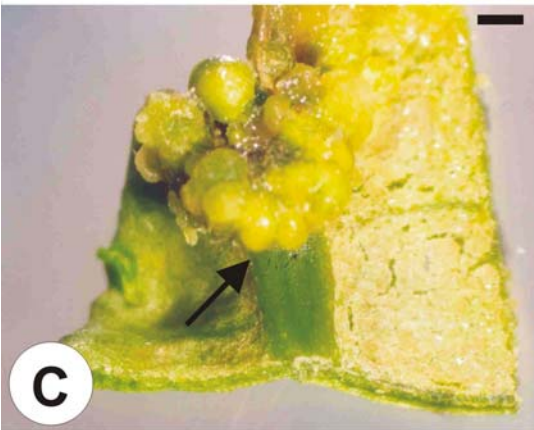
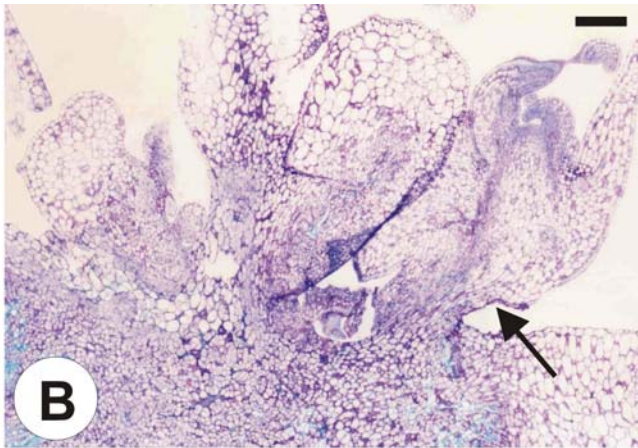
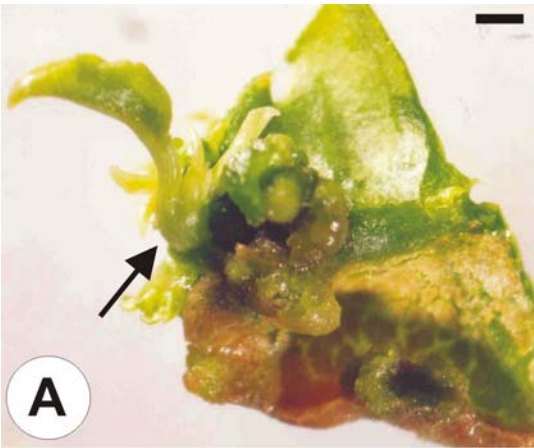


Figura 22. Explante foliar aos 25 dias em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. **A.** Protuberâncias (setas) formadas na região da nervura central. **B.** Corte longitudinal das protuberâncias indicadas em **A.** Essas formações são constituídas por diferentes padrões celulares: células periféricas (seta) com citoplasma denso e células centrais (cc) com caráter parenquimático. Em **B** e **C** é possível verificar a ausência de definição das camadas periféricas dessas protuberâncias. **D.** Corte longitudinal da protuberância submetida ao teste com o corante “Aniline blue black” para evidenciar proteínas. Observe que as células periféricas coram diferentemente das células centrais (cc).

Barras: A = $450 \mu\text{m}$; B = $199 \mu\text{m}$; C = $199 \mu\text{m}$; D = $74 \mu\text{m}$.

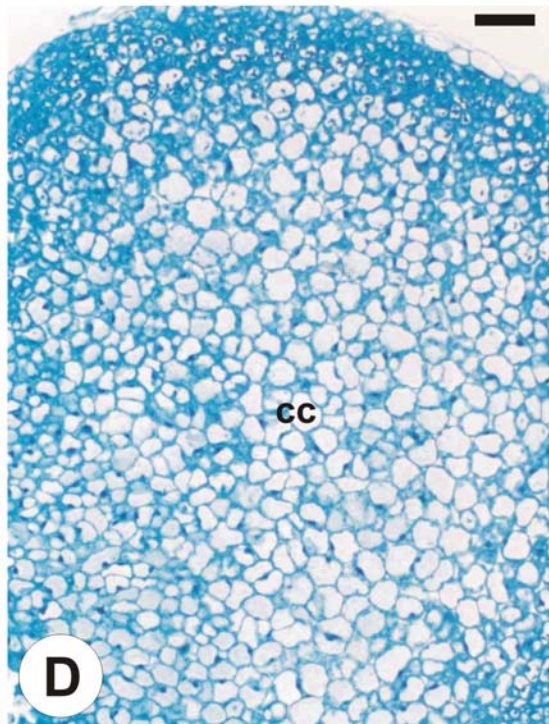
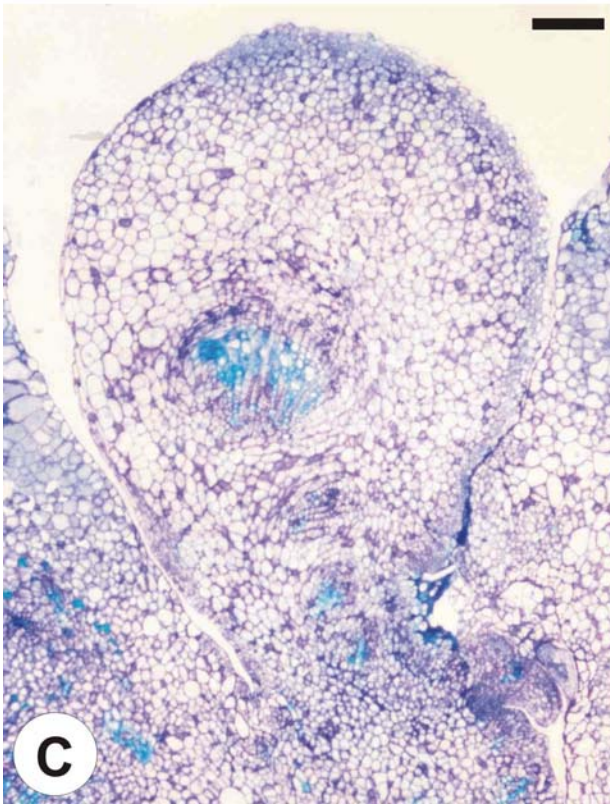
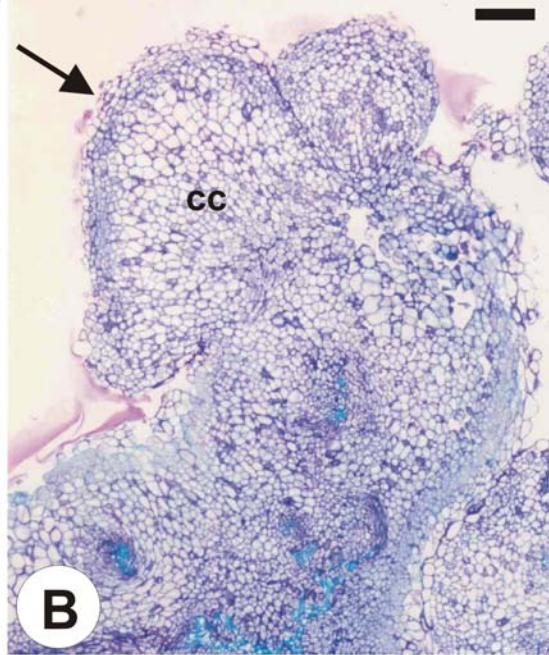
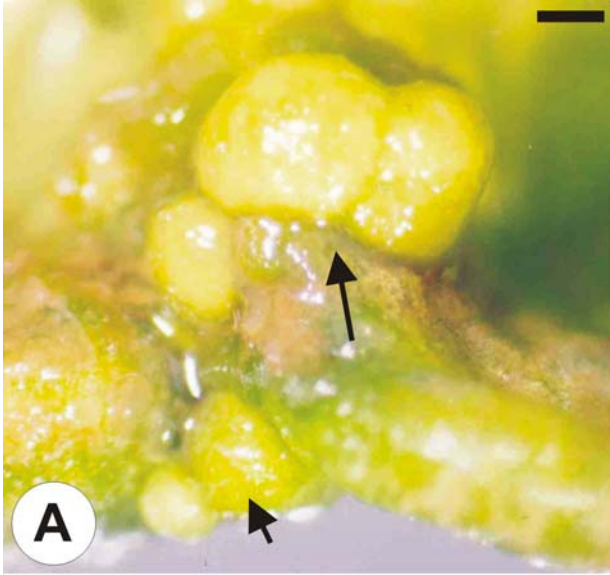


Figura 23. A-B. Elétron-micrografias de protuberâncias formadas nos explantes foliares em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco. Observe a falta de definição da superfície das estruturas formadas aos 21 (**A**) e 30 (**B**) dias de cultivo *in vitro*. Em **B** é possível observar o aumento em tamanho das estruturas e seu envolvimento por substância de natureza pécica (p).

Barras: A = $100 \mu\text{m}$; B = $300 \mu\text{m}$.

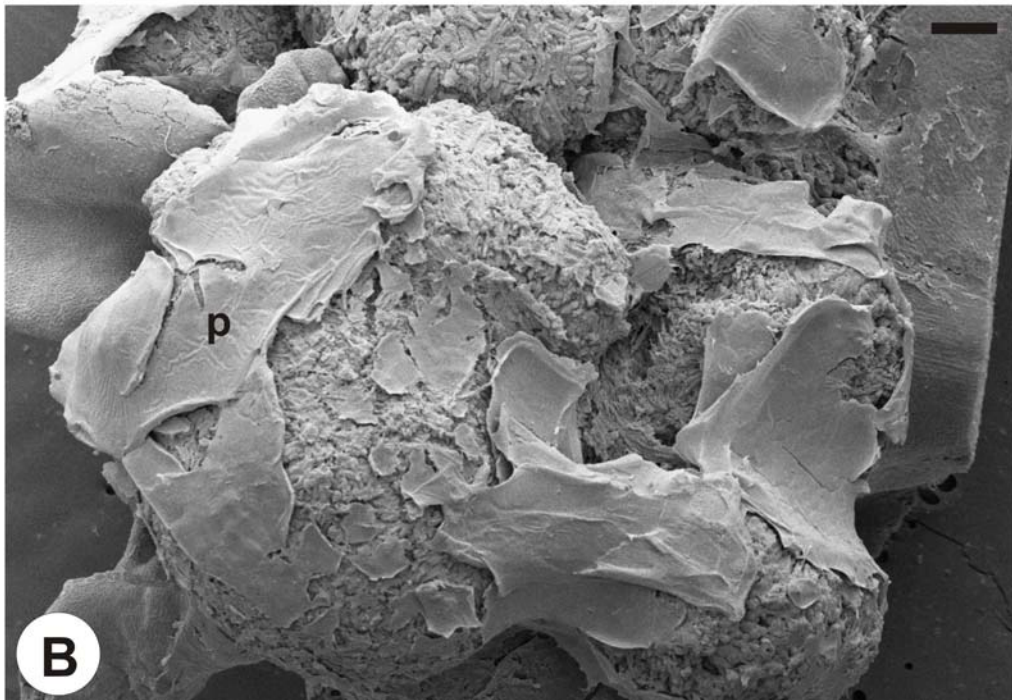
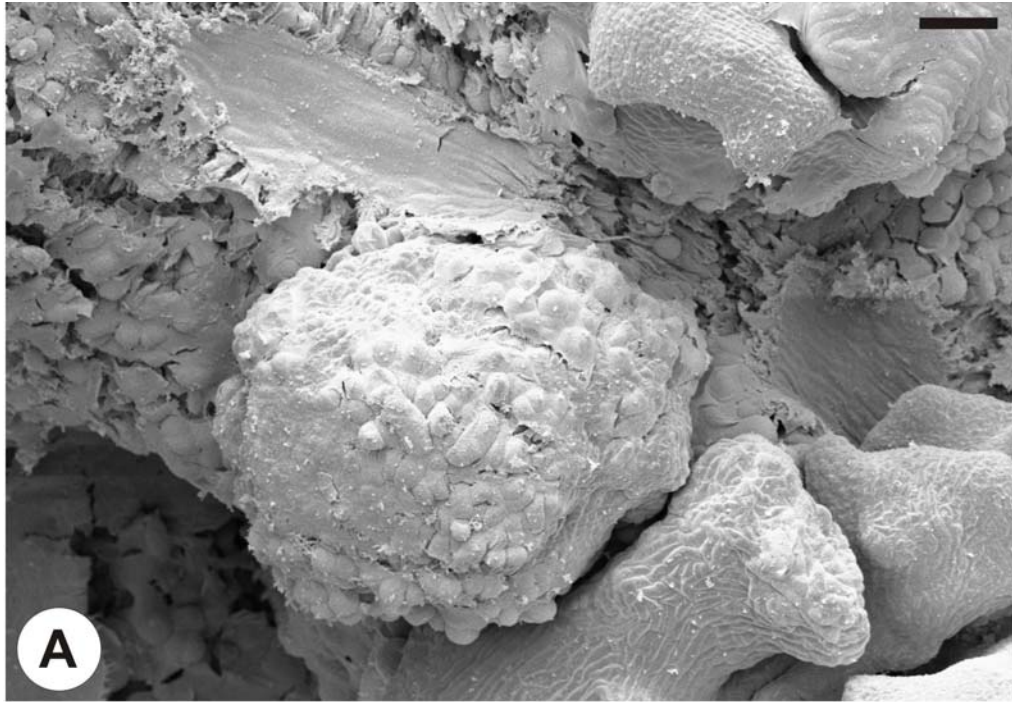
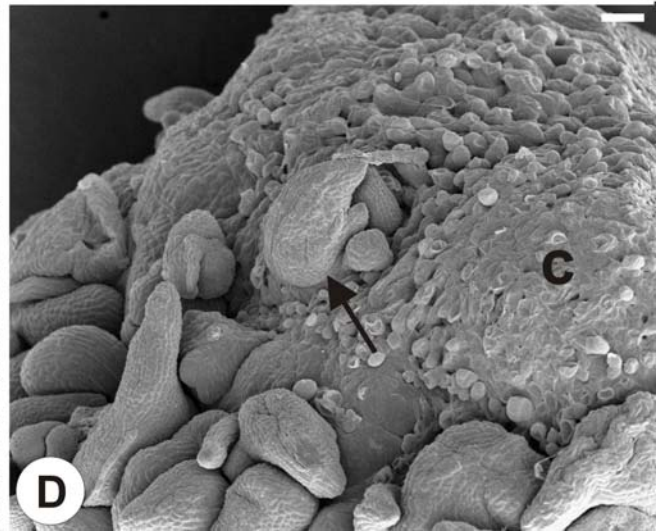
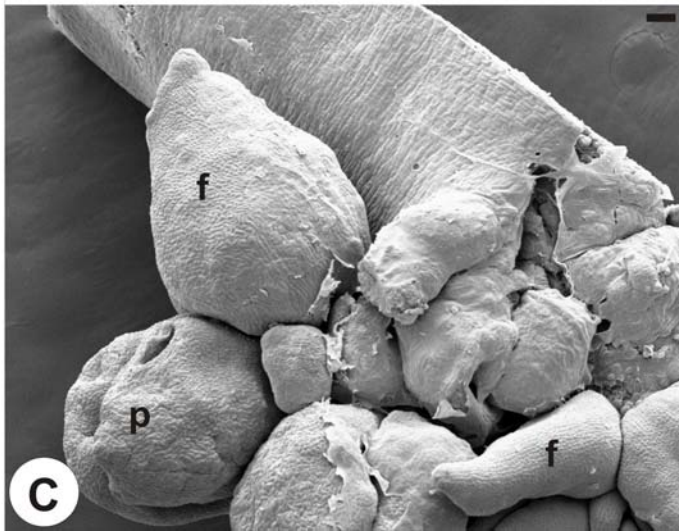
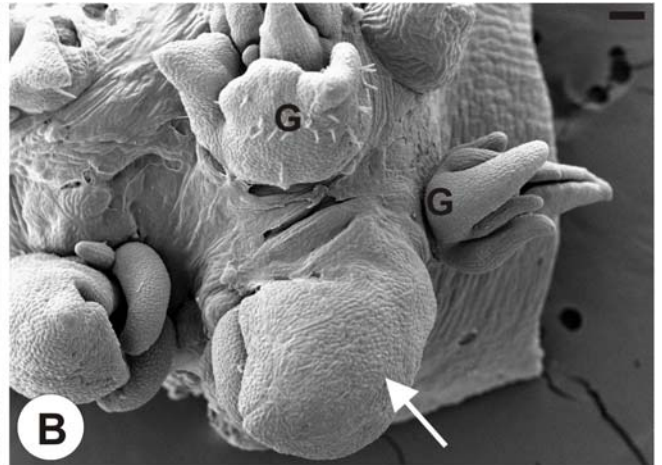
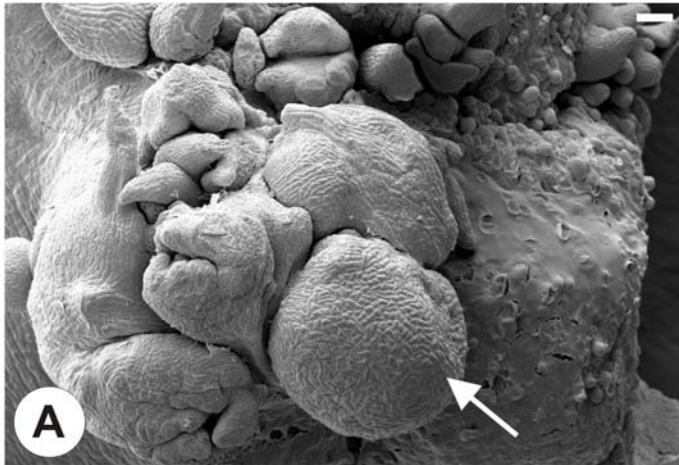


Figura 24. A-D. Elétron-micrografias de gemas e protuberâncias formadas a partir de explantes hipocotiledonares inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e na ausência de água de coco. **A.** Protuberância (seta) formada no tecido do explante. **B.** Gemas (G) e uma protuberância em processo de diferenciação (seta). **C.** Protuberância (p) e estruturas foliares (f). **D.** Calo (C) formado na região de seccionamento do explante e regeneração (seta) formada a partir desse calo.

Barras: A, B, C, D = $100 \mu\text{m}$.



APÊNDICES

APÊNDICE I

Dados de proporções, em geral, são analisados usando um modelo de regressão binomial que é um exemplo de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972). Supõe-se que o número de respostas morfogênicas Y_i , de um total de m_i (8) explantes, $i = 1, 2, \dots, n$, são variáveis aleatórias, o modelo binomial padrão assume que $Y_i \sim \text{Bin}(m_i, p_i)$, em que p_i é a probabilidade de um explante expressar resposta morfogênica, com média $\mu_i = E(Y_i) = m_i p_i$ e variância $\text{Var}(Y_i) = m_i p_i (1-p_i)$. O modelo linear generalizado permite modelar as proporções esperadas p_i em termos de variáveis explanatórias x_i (efeitos de tipos de explantes) através de $g(p_i) = x_i' \beta$, em que g é uma função de ligação adequada e β , é o vetor de parâmetros. A função de ligação mais comum é logit, isto é, $g(p_i) = \ln[p_i/(1-p_i)]$, mas outras escolhas comuns são o probit e o complemento log-log. Para esta situação foi usada a função de ligação logit. Para um modelo bem ajustado, espera-se que a *deviance* residual (uma medida do ajuste do modelo) seja aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo.

Tratamento 1: Explantes foliares e hipocotiledonares inoculados em meio MS contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA e 5% de água de coco aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

15^o dia

Disco foliar	Resp.Morfogênica	Hipocótilo	Resp.Morfogênica
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	1
1	0	1	0
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	1
2	1	2	0
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
2	1	2	1
3	1	3	1
3	1	3	1
3	1	3	1
3	1	3	1
3	1	3	1
3	1	3	1
3	1	3	1
4	1	4	1
4	1	4	1
4	0	4	0
4	1	4	1
4	1	4	1
4	0	4	0
4	1	4	1
4	1	4	1
5	1	5	1
5	1	5	1
5	1	5	1
5	0	5	0
5	1	5	0
5	1	5	0
5	0	5	0
5	1	5	1
Total	34	6	1
		6	1
		6	1
		6	1
		6	1
		6	0
		6	1
		6	0
		Total	37

APÊNDICE II

Os dados foram provenientes de uma contagem, assim o modelo considerado foi o Modelo de Poisson, em que se supõe que a variável aleatória Y_i representa contagens com média $E(Y_i) = \mu_i$, variância $\text{Var}(Y_i) = \mu_i$ e com função de ligação logarítmica, $g(\mu_i) = \ln(\mu_i)$.

Para um modelo bem ajustado, espera-se que a *deviance* residual (uma medida do ajuste do modelo) seja aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo. Quando isto não acontece, uma explicação é que a variação pode, simplesmente, ser maior do que a esperada pelo modelo e este fenômeno é chamado superdispersão (Hinde e Demétrio, 1998). Uma forma gráfica para verificar se o modelo está bem ajustado aos dados é através do uso do gráfico meio-normal (*half-normal plot*). Uma maneira de modelar a superdispersão é mudar a função de variância do modelo original por uma forma mais geral dada por $\text{Var}(Y_i) = \phi\mu_i$ em que ϕ é conhecido como parâmetro de superdispersão. Outra forma é através do modelo binomial negativo em que $\text{Var}(Y_i) = \mu_i (1 + \phi\mu_i)$. A inferência, quando os dados apresentam dispersão maior ou menor do que a esperada no modelo probabilístico, pode ser feita usando a estatística:

$$F_{calc} = \frac{D_2 - D_1}{(f_2 - f_1) \hat{\phi}}$$

sendo D_2 a deviance residual para o modelo 2 com f_2 graus de liberdade e D_1 a deviance residual para o modelo 1 com f_1 graus de liberdade.

Tratamento 2: Explantes foliares e hipocotiledonares aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco.

Disco foliar		Hipocótilo	
protuberâncias	gemas	protuberâncias	gemas
6	1	1	4
3	0	2	1
6	1	0	4
9	0	0	6
5	0	2	4
5	0	3	4
8	0	2	5
10	0	3	4
9	2	1	5
8	0	1	10
6	1	1	1
8	0	2	2
7	0	6	2
6	0	2	2
4	1	0	5
2	3	2	2
4	1	2	1
2	1	1	1
8	0	2	3
2	0	0	2
5	1	4	5
8	1	1	2
5	0	1	2
4	1	0	3
1	2	1	0
6	0	5	1
3	1	0	9
3	1	0	8
2	0	0	4
0	1	3	5
6	2	2	5
4	2	4	6
11	0	2	3
3	0	2	2
8	0	1	4
11	0	0	2
9	0	1	0
9	0	4	1
7	0	0	0
Total: 223	23	1	10
		2	1
		5	0
		4	2
		4	1
		2	0
		3	3
		0	3
		Total: 85	150

APÊNDICE III

Para um modelo bem ajustado, espera-se que a *deviance* residual (uma medida do ajuste do modelo) seja aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo. Quando isto não acontece, uma explicação é que a variação pode, simplesmente, ser maior do que a esperada pelo modelo e este fenômeno é chamado superdispersão (Hinde e Demétrio, 1998). Uma forma gráfica para verificar se o modelo está bem ajustado aos dados é através do uso do gráfico meio-normal (*half-normal plot*).

Uma maneira de modelar a superdispersão é mudar a função de variância do modelo original por uma forma mais geral dada por $\text{Var}(Y_i) = \phi\mu_i$ em que ϕ é conhecido como parâmetro de superdispersão. Outra forma é através do modelo binomial negativo em que $\text{Var}(Y_i) = \mu_i(1 + \phi\mu_i)$. A inferência, quando os dados apresentam dispersão maior ou menor do que a esperada no modelo probabilístico, pode ser feita usando a estatística:

$$F_{calc} = \frac{D_2 - D_1}{(f_2 - f_1) \hat{\phi}}$$

sendo D_2 a *deviance* residual para o modelo 2 com f_2 graus de liberdade e D_1 a *deviance* residual para o modelo 1 com f_1 graus de liberdade.

Tratamento 1: Meio de cultura MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA e 5% de água de coco.

Explante	15 ^o dia		30 ^o dia	
	protuberâncias	Gemas	protuberâncias	Gemas
1	1	2	0	3
1	3	0	1	4
1	0	3	0	3
1	2	0	1	3
1	3	1	0	1
1	2	2	1	3
1	1	1	0	2
1	3	2	0	3
2	1	5	0	6
2	2	7	0	7
2	2	2	3	4
2	0	0	3	5
2	1	2	2	4
2	1	1	2	4
2	0	2	0	3
2	0	3	1	5
3	2	0	2	1
3	0	0	1	3
3	0	1	1	2
3	1	1	1	2
3	2	0	1	1
3	1	1	0	2
3	2	0	1	2
3	1	0	1	1
4	1	1	0	3
4	0	0	0	1
4	2	3	0	8
4	0	1	0	2
4	0	0	0	2
4	2	1	2	2
4	2	0	1	2
4	0	1	0	2
5	3	0	1	4
5	0	2	0	4
5	0	3	0	4
5	0	4	0	4
5	3	0	0	2
5	3	1	0	3
5	1	1	0	4
5	1	0	0	1
Total	48	54	26	122

Tratamento 2: Meio de cultura MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BA sem adição de água de coco.

Explante	15º dia		30º dia	
	protuberâncias	gemas	protuberâncias	Gemas
1	1	1	0	1
1	1	1	0	6
1	2	0	0	1
1	0	1	0	3
1	0	0	0	3
1	1	0	3	0
1	2	0	0	3
1	4	3	0	5
2	2	2	2	2
2	0	0	0	0
2	2	0	0	2
2	1	0	0	5
2	4	2	2	4
2	0	0	0	3
2	2	0	0	2
2	0	0	0	3
3	0	0	1	1
3	0	1	2	2
3	0	2	0	3
3	3	1	1	4
3	0	0	0	2
3	1	0	1	2
3	1	1	0	3
3	3	1	0	2
4	1	3	1	3
4	0	0	0	0
4	1	0	3	1
4	0	4	0	4
4	1	0	2	2
4	2	3	2	3
4	6	1	0	3
4	3	0	0	3
5	1	0	1	1
5	2	1	2	2
5	2	3	0	3
5	2	0	2	0
5	2	0	2	2
5	3	1	2	0
5	0	0	0	0
5	0	1	0	0
Total	56	33	29	89