

LARISSA MACEDO WINKLER

**ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MARACUJÁ
AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG.) COM OS GENES
CMe-ACO1 AS E *nptII* VIA *Agrobacterium tumefaciens***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Marguerite G. G. Quoirin

CURITIBA
2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **LARISSA MACEDO WINKLER**, sob o título "**ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) COM OS GENES CMe-ACO1 AS E nptII VIA *Agrobacterium tumefaciens***", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 13 de Dezembro de 2001.


Professora Dra. Marcia W. Schuch
Primeira Examinadora


Professor Dr. Ricardo Antonio Ayub
Segundo Examinador


Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Terceira Examinadora


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Quarto Examinador


Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por possibilitar a realização de meu doutorado.

À Professora Doutora Marguerite G. G. Quoirin, pela orientação e amizade que dedicou a mim nestes três anos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa Speed Cópias, pela impressão deste trabalho.

Ao professor Doutor Ricardo Ayub, co-orientador deste trabalho, pelo fornecimento do plasmídeo para a transformação genética com *Agrobacterium*.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, em especial ao professor Luiz Antônio Biasi, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

À pesquisadora Neusa Maria C. Stenzel do Instituto Agrônomo do Paraná–IAPAR – PR, pelo fornecimento das mudas de maracujá amarelo.

Aos professores César Valmor Rombaldi e Jorge Adolfo Silva, e ao aluno Márcio Zanuzo, do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, pela amizade, apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor João Baptista Silva, do Departamento de Física e Matemática da Universidade Federal de Pelotas, pela contribuição estatística para este trabalho.

Aos colegas, amigos e funcionários do Laboratório de Micropropagação de plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, em especial à estagiária Kellyn Carneiro.

Às amigas Cyntia, Marlene e Priscila pelo carinho e amizade nos momentos difíceis.

Ao meu noivo Sandro Döerr, pelo amor, amizade, carinho e compreensão em todos os momentos.

À minha família pelo carinho e atenção, em especial aos meus pais Eliezer I. G. Winkler e Adiles Macedo Winkler, pelo amor, carinho, apoio incondicional e incentivo, que tornaram possível a minha chegada até aqui.

BIOGRAFIA DO AUTOR

LARISSA MACEDO WINKLER, filha de Eliezer I. G. Winkler e Adiles Macedo Winkler, nasceu em 9 de dezembro de 1973, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

Estudou no Instituto de Educação Assis Brasil em Pelotas, onde completou seus estudos de primeiro e segundo graus. Em 1991, ingressou no Curso de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, onde foi graduada como Engenheira Agrônoma em dezembro de 1995.

Durante o período de graduação, foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Botânica da UFPel. Realizou estágio no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa (CPACT), Pelotas - RS. Realizou estágio na Faculdade de Farmácia e Biologia da Universidade de Valência - Espanha, em fevereiro e março de 1996. Em março de 1998 recebeu o título de Mestre em Fitotecnia, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). No mesmo mês e ano, ingressou no Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	ix
	LISTA DE FIGURAS	xi
	LISTA DE ABREVIATURAS	xv
	RESUMO	xvi
	ABSTRACT	xvii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	A CULTURA DO MARACUJAZEIRO	5
2.2	A BIOTECNOLOGIA APLICADA À CULTURA DO MARACUJAZEIRO.....	5
2.2.1	Regeneração de gemas em maracujá.....	7
2.3	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.3.1	Genes marcadores e repórteres.....	12
2.3.2	Identificação da planta transformada por <i>PCR</i>	13
2.4	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM MARACUJÁ.....	14
2.5	TÉCNICA DO RNA <i>antisense</i>	14
2.6	ETILENO.....	15
2.6.1	Biossíntese do etileno.....	16
2.6.2	Enzimas ACCsintetase e ACCoxidase.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	EXPERIMENTOS DE ORGANOGÊNESE.....	21
3.1.1	Manutenção das plantas matrizes.....	21
3.1.2	Desinfestação e obtenção de explantes.....	22
3.1.3	Meios de cultura e condições de crescimento.....	22
3.1.4	Experimentos de organogênese a partir de explantes jovens.....	23
3.1.5	Experimentos de organogênese a partir de explantes adultos.....	23
3.1.6	Experimento de alongamento e enraizamento a partir de explantes jovens e adultos.....	23
3.1.7	Delimitações utilizadas e análise estatística.....	23

3.2	EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	24
3.2.1	Transferência do plasmídeo pGA643 de <i>Escherichia coli</i> para a cepa de <i>Agrobacterium</i>	25
3.2.2	Preparo das bactérias para a inoculação em tecido vegetal.....	26
3.2.3	Teste de resistência ao antibiótico canamicina.....	26
3.2.4	Teste de co-cultura.....	27
3.2.5	Ensaio de transformação.....	28
3.2.6	Análise das plantas por PCR.....	29
3.2.6.1	Extração do DNA genômico.....	30
3.2.6.2	Reação de PCR.....	30
3.3	COLORIMETRIA, PRODUÇÃO DE ETILENO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACCO EM FRUTOS DE MARACUJÁ.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	EXPERIMENTO DE ORGANOGÊNESE A PARTIR DE MATERIAL JOVEM.....	34
4.1.1	Porcentagem de explantes com gemas.....	34
4.1.2	Número médio de gemas por explante foliar.....	36
4.1.3	Número médio de folhas por explante.....	38
4.1.4	Comprimento médio das folhas.....	39
4.1.5	Comprimento médio da haste principal.....	40
4.1.6	Porcentagem de explantes com calos.....	42
4.2	EXPERIMENTO DE ORGANOGÊNESE A PARTIR DE MATERIAL ADULTO.....	43
4.2.1	Porcentagem de explantes com gemas.....	45
4.2.2	Número médio de gemas por explante foliar.....	49
4.2.3	Número médio de folhas por explante foliar.....	50
4.2.4	Comprimento médio das folhas.....	51
4.2.5	Comprimento médio da haste principal.....	53
4.2.6	Porcentagem de explantes com calos.....	54
4.3	DISCUSSÃO GERAL SOBRE A ORGANOGÊNESE DE MATERIAL JOVEM E ADULTO.....	56
4.4	EXPERIMENTO DE ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS BROTOS DE MARACUJÁ-AMARELO REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.....	57

4.5	EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO.....	58
4.5.1	Avaliação da resistência ao antibiótico canamicina.....	58
4.5.2	Experimento de co-cultura dos explantes.....	59
4.5.3	Obtenção e avaliação das plantas resistentes à canamicina, pela técnica de <i>PCR</i>	60
4.6	ANÁLISE COLORIMÉTRICA DE FRUTOS COMERCIAIS DE MARACUJÁ-AMARELO.....	65
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETILENO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACCO EM FRUTOS DE MARACUJÁ-AMARELO.....	66
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Procedência dos genótipos de maracujá-amarelo, fornecidos pelo IAPAR.....	21
TABELA 2.	Programação do termociclador Progene ® utilizado para as reações de <i>PCR</i>	32
TABELA 3.	Efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material jovem de maracujá-amarelo. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura.....	34
TABELA 4.	Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipo IAPAR: 309. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura.....	44
TABELA 5.	Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipo IAPAR: 352. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura.....	44
TABELA 6.	Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipo IAPAR: 156 x 123. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura.....	45
TABELA 7.	Médias do número de gemas por explante, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.....	49
TABELA 8.	Médias do comprimento de folhas por explante, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.....	53

TABELA 9.	Médias do comprimento da haste principal, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.....	54
TABELA 10.	Médias da porcentagem de explantes foliares que formaram calos, para três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, obtidas para quatro tratamentos e duas posições de cultivo do explante no meio de cultura.....	55
TABELA 11.	Efeito de dois tratamentos sobre o alongamento e enraizamento de brotos de maracujá-amarelo, regenerados a partir de explantes foliares, após sessenta dias de cultivo (média das duas repetições do experimento).....	58
TABELA 12.	Efeito da canamicina na porcentagem de sobrevivência de explantes foliares de maracujá-amarelo, após trinta dias de cultivo.....	59
TABELA 13.	Efeito do tempo de co-cultura na porcentagem de sobrevivência dos explantes foliares de maracujá-amarelo, após trinta dias.....	60
TABELA 14.	Porcentagem de plantas PCR +, de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , obtidas a partir da inoculação dos explantes com a cepa EHA101 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , contendo os genes nptII e <i>antisense</i> da ACCO.....	62
TABELA 15.	Valores absolutos da cor de frutos comerciais de maracujá-amarelo, classificados em três grupos: predominantemente verde, predominantemente colorido e totalmente colorido, obtidos por colorimetria.....	65
TABELA 16.	Produção de etileno nos frutos de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg., determinada após 1 e 2 horas por cromatografia gasosa.....	66
TABELA 17.	Atividade da enzima ACCO em frutos de maracujá-amarelo, obtida pela produção de etileno, determinada por cromatografia gasosa.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Biossíntese do etileno, adaptado de YANG e HOFFMAN (1984).....	17
FIGURA 2.	Esquema geral de região T-DNA do pGA643 contendo o cDNA da ACCO em orientação <i>antisense</i> . BE: borda esquerda; nptII: neomicina fosfotransferase II; P35S: promotor 35S do CaMV; SMC: sítio de multiclonagem (H- <i>HindIII</i> , X- <i>XbaI</i> , S- <i>SacI</i> , Hp- <i>HpaI</i> , K- <i>KpnI</i> , C- <i>ClaI</i> , B- <i>BglII</i>); LEM1: clone da ACCO do melão em orientação <i>antisense</i> ; T7-5: terminador do plasmídeo Ti; BD: borda direita.....	25
FIGURA 3.	Segmentos nodais de maracujá-amarelo, regenerados a partir de explantes foliares em meio MS + 1,5 mg.L ⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo, que serviram de explantes para a transformação genética com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
FIGURA 4.	Efeito de três concentrações de BAP na porcentagem de formação de gemas, a partir de explantes foliares de material jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.....	35
FIGURA 5.	Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio de gemas regeneradas por explante foliar jovem de maracujá-amarelo, médias para a posição abaxial do explante no meio de cultura.....	37
FIGURA 6.	Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio de gemas regeneradas por explante foliar jovem de maracujá-amarelo, médias para a posição adaxial do explante no meio de cultura.....	37

FIGURA 7.	Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio das folhas dos brotos regenerados a partir de explante jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.....	39
FIGURA 8.	Efeito de três concentrações de BAP sobre o comprimento médio das folhas dos brotos regenerados a partir de explante jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.....	40
FIGURA 9.	Efeito de três concentrações de BAP sobre o comprimento médio da haste principal dos brotos regenerados a partir de material jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.....	41
FIGURA 10.	Efeito de três concentrações de BAP sobre a porcentagem de explantes jovens de maracujá-amarelo que formaram calos, médias para a posição abaxial do explante no meio de cultura.....	42
FIGURA 11.	Efeito de três concentrações de BAP sobre a porcentagem de explantes jovens de maracujá-amarelo que formaram calos, médias para a posição adaxial do explante no meio de cultura.....	43
FIGURA 12.	Porcentagem de explantes que regeneraram gemas para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, na posição adaxial de cultivo.....	46
FIGURA 13.	Porcentagem de explantes que regeneraram gemas para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, na posição abaxial de cultivo.....	47
FIGURA 14.	Broto regenerado do genótipo 352 de maracujá-amarelo, em meio MS + 1,5 mg.L ⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo.....	48

FIGURA 15.	Broto regenerado de maracujá-amarelo, genótipo 156 x 123 em meio MS + 1,5 mg.L ⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo.....	48
FIGURA 16.	Número médio de gemas regeneradas a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.....	50
FIGURA 17.	Número médio de folhas em brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, nas posições abaxial e adaxial de cultivo.....	51
FIGURA 18.	Comprimento médio das folhas em brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.....	52
FIGURA 19.	Comprimento médio da haste principal de brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.....	54
FIGURA 20.	Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primers específicos dos genes <i>sense</i> (1200 pb) e <i>antisense</i> (850 pb) da enzima ACCoxidase e <i>nptII</i> (800 pb): 1: marcador λ /HindIII; 2: planta regenerada de maracujá (ACCO <i>antisense</i>); 3: planta regenerada de maracujá (ACCO <i>sense</i>); 4: planta regenerada de maracujá (<i>nptII</i>); 5: plasmídeo pGA643 (ACCO <i>antisense</i>); 6: plasmídeo pGA643 (<i>nptII</i>); 7: controle, melão <i>Cantaloupe</i> (ACCO <i>sense</i>); 8: controle, melão <i>Cantaloupe</i> (ACCO <i>antisense</i>); 9: controle, melão (<i>nptII</i>).....	62

FIGURA 21.	Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primers específicos dos genes <i>sense</i> (1200 pb) e <i>antisense</i> (850 pb) da enzima ACCoxidase e <i>nptII</i> (800 pb): 1: marcador λ /HindIII; 2: controle, melão <i>Cantaloupe</i> (ACCO <i>antisense</i>); 3: controle, melão <i>Cantaloupe</i> (ACCO <i>sense</i>); 4: controle, melão <i>Cantaloupe</i> (<i>nptII</i>); 5: planta regenerada de maracujá (ACCO <i>antisense</i>); 6: planta regenerada de maracujá (ACCO <i>sense</i>); 7: planta regenerada de maracujá (ACCO <i>antisense</i> + <i>nptII</i>); 8: plasmídeo pGA643 (ACCO <i>antisense</i>); 9: plasmídeo pGA643 (ACCO <i>antisense</i> + <i>nptII</i>).....	63
FIGURA 22.	Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primer específico do gene <i>nptII</i> (800 pb). 1: marcador λ /HindIII; 2 e 3: plantas regeneradas de maracujá (<i>nptII</i>); 4 a 13: plantas regeneradas, PCR negativo; 14: planta regenerada de maracujá (<i>nptII</i>).....	64
FIGURA 23.	Frutos comerciais de maracujá-amarelo classificados por colorimetria em três grupos, de acordo com o estágio de maturação. 1: predominantemente verde; 2: predominantemente colorido; 3: totalmente colorido.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC= ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano
ACCS= enzima ACC sintetase
ACCO= enzima ACC oxidase
AIA= ácido indolacético
AIB= ácido indolbutírico
ANA= ácido naftalenoacético
ATP= adenosinatrifosfato
BAP= 6-benziladenina ou 6-benzilaminopurina
cDNA= clone molecular de um fragmento de DNA
GA₃= ácido giberélico
2iP= isopenteniladenina ou 6- dimetilalilaminopurina
Kb= kilo base, 1Kb= 1000 pares de bases
KDa= kilo dalton
Km= canamicina
MS= meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
PCR= reação da polimerase em cadeia
Primers= seqüência de oligonucleotídeos sintéticos
Rif= rifampicina
Sm= streptomomicina
Sp= spectinomomicina
Tc= tetraciclina
YEB= meio de cultura para bactérias (Yeast Extract Broth)

RESUMO

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Seus frutos, de grande valor nutricional e farmacêutico são comercializados *in natura* e industrializados, garantindo o abastecimento do mercado interno e exportação. Contudo, seus frutos perdem grande quantidade de água durante o processo de maturação, conferindo à eles um aspecto de murcha em poucos dias, além de aumentar a fragilidade durante o transporte. Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo, introduzir em tecidos desta espécie o gene que codifica para a enzima ACCO, em orientação *antisense*, via *Agrobacterium tumefaciens*. Esta enzima é responsável pela conversão do ácido 1-carboxílico -1 - aminociclopropano (ACC) em etileno, promovendo a maturação dos frutos. Como controle do processo de transformação, foi utilizado o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e que foi introduzido com sucesso nesta espécie em trabalhos anteriores. A transformação genética só é obtida com sucesso, se os explantes potencialmente transgênicos adquirirem aptidão para regenerar uma nova planta. Neste sentido, dois experimentos de organogênese foram realizados. Neles avaliou-se o efeito da idade fisiológica dos explantes (jovem e adulto); da posição de cultivo dos explantes (abaxial e adaxial) e o efeito da citocinina BAP: 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ na porcentagem de explantes com gemas, no número médio de gemas por explante, número médio de folhas por explante, comprimento médio das folhas, comprimento da haste principal e porcentagem de explantes que formaram calos. Os experimentos foram realizados sob delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada tratamento e dez explantes por parcela. A concentração 1,5 mg.L⁻¹ de BAP promoveu os melhores resultados para todas as variáveis avaliadas, em ambas as posições de cultivo do explante e para tecidos jovens e adultos. Foi observada formação excessiva de calos na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Explantes foliares jovens, oriundos de sementes, regeneraram gemas adventícias em 50,22% dos casos após 30 dias de cultivo, em ambas as posições do explante no meio de cultura. Já os genótipos IAPAR 309, 156 x 123 e 352 (material adulto), apresentaram maior porcentagem de explantes regenerados quando estes foram cultivados na posição adaxial. O alongamento e enraizamento dos brotos foram obtidos em ambos os tratamentos: MS e MS/2 + 1 mg.L⁻¹ de GA₃. No entanto, o segundo tratamento resultou em maior comprimento de haste (3,73 cm), número médio de raízes por plântula (2,08) e comprimento de raízes (6,64 cm) após 60 dias de cultivo. Nos ensaios com *Agrobacterium*, apenas uma planta de seis regeneradas e enraizadas em meio seletivo apresentou o gene *antisense* da ACCO, com uma eficiência de transformação de 1,43%. Para o gene *nptII* esta eficiência foi de 4,3%. Estes resultados foram confirmados pela técnica de *PCR*. Uma análise colorimétrica de frutos comerciais foi realizada e permitiu a classificação destes frutos em três grupos: predominantemente verde, predominantemente colorido e totalmente colorido. A produção de etileno e atividade enzimática da ACCO foi avaliada, mostrando que o maracujá – amarelo é produtor intermediário de etileno e que a atividade enzimática da ACCO é limitada, necessitando de cofatores para sua atividade máxima.

Palavras-chave: Maracujá; organogênese; *Agrobacterium*; etileno; ACCO.

ABSTRACT

Brazil is the main world producer of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Fruits have a great nutritive and pharmaceutic value. They are commercialized *in natura* and industrialized for national market and exportation. Passion fruits present a high loss of water during fruit ripening, what is a concern for transport. In order to improve fruit quality and storage life, experiments were carried out for regeneration of plants from leaf explants of *Passiflora edulis* and for introduction of an antisense melon ACCoxidase gene (LEM1) via *Agrobacterium tumefaciens* strain carrying binary vectors. During climateric fruits ripening process, like yellow passionfruit, 1-carboxylic-1-aminocyclopropane (ACC) is converted into ethylene by the action of ACCoxidase enzyme. Two regeneration experiments were conducted, using Murashige and Skoog (1962) as basic medium. The effect of several factors was evaluated: physiological age of the explants (juvenile and adult), position of the explant on culture medium (with abaxial or adaxial face in contact with the medium), and three concentrations of benzyladenine (BAP) (1.0, 1.5 and 2.0 mg.L⁻¹). The following data were recorded: percentage of regenerating leaf explants, mean number of buds per explant, mean number of leaves, mean length of the regenerated shoots and percentage of explants forming calli. Every experiment was repeated twice, each treatment had four repetitions of ten leaf explants each. The concentration of 1.5 mg.L⁻¹ originated the best results for all the recorded datas for both positions and for juvenile and adult material. Callogenesis was high in the presence of 2 mg.L⁻¹ BAP. For juvenile material grown from seeds, 50,22% of the explants formed adventitious buds by organogenesis for both positions of the explants. For adult material, IAPAR genotypes 309, 156 x 123 and 352 originated the highest percentages of adventitious buds when cultivated with adaxial face in contact with the medium. Elongation and rooting of the regenerated shoots were obtained in the presence of MS medium or half-strength salts of MS medium and 1 mg.L⁻¹ of gibberellic acid. However, stem size, mean root number, and size were higher on the half strenght of MS salts. Through transformation experiments, leaf explants were co-cultured with disarmed *A. tumefaciens* vector pGA643 carrying *LEM1* gene and EHA101 strain containing a plasmid harbouring a *NOS/NPTII* gene. Three plants among nine growing in the presence of kanamycin were transformed with *NPTII* gene, and one plant among six growing in the presence of kanamycin contained *LEM1* gene, with 4.3% and 1.43% of transformation efficiency, respectively, as indicated by PCR analysis. Colorimetric analysis of commercial fruits allowed to classify them into three groups: mainly green, mainly colored and partially colored. Ethylene production and enzymatic activity of ACCoxidase were measured and indicated that yellow passion fruit is an intermediary producer of ethylene and that ACCoxidase has a limited activity and needs cofactors to reach a maximum value.

Key-words: Passion fruit; organogenesis; *Agrobacterium*; ethylene; ACCO.

1 INTRODUÇÃO

Entre as principais espécies cultivadas do gênero *Passiflora*, encontra-se o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), planta trepadeira, semilenhosa e perene, que produz frutos ricos em minerais e vitaminas, principalmente A e C, muito apreciados pela qualidade de seu suco, de aroma e sabor agradáveis (JOSÉ *et al.*, 1997).

O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e sua distribuição geográfica no Brasil concentra-se na região Centro-Norte. No entanto, a origem do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) é incerta. Acredita-se que ele é originário do cruzamento de *P. edulis* (maracujá-roxo) com alguma espécie relacionada ou de uma mutação do *P. edulis*. Estas duas espécies diferem principalmente pela coloração dos frutos, sabor e resistência a doenças (SOUSA e MELETTI, 1997).

Suas folhas contêm princípios ativos de uso farmacêutico como a maracujina, passiflorina e calmofilase, que atuam como sedativos e antiespasmódicos. Por ser uma cultura com longo período de safra, que pode variar de 8 a 12 meses dependendo da região, o maracujazeiro permite um fluxo equilibrado de renda mensal ao produtor, elevando o padrão de vida de pequenos produtores rurais (SOUSA e MELETTI, 1997).

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá, com produção no ano de 1999 (dados mais recentes publicados), de 298 mil toneladas (FNP, 2001). Em anos anteriores chegou a 400 mil toneladas. Além do fruto *in natura*, também a exportação de seu suco é de extrema importância, contribuindo para o crescimento produtivo e econômico desta espécie no país.

A grande variabilidade genética existente, o ciclo relativamente curto e o interesse crescente por esta cultura, são alguns fatores que contribuem para um estudo mais aprofundado das características genéticas e morfofisiológicas desta espécie (JOSÉ *et al.*, 1997).

Os principais objetivos dos programas de melhoramento do maracujazeiro são alta produtividade e alto vigor, resistência ou tolerância a pragas e doenças, adaptação ampla, frutos grandes, alto teor de suco, resistência ao transporte e armazenamento. A vida útil pós-colheita é muito variável, sendo de no máximo uma semana em boas condições e uns 10 a 15 dias com aspecto de murcho. O principal problema é a perda de água.

Recentemente foram elaboradas as normas para classificação do fruto do maracujá, pelo CEAGESP (Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo) e ficou definida uma classificação em três grupos: predominantemente verde, predominantemente colorido e totalmente colorido. Quanto ao aspecto do fruto durante o armazenamento, o etileno exerce um papel importante, pois atua no processo de maturação dos frutos.

Vários estudos foram conduzidos na intenção de isolar e caracterizar os genes envolvidos na biossíntese do etileno. Sabe-se que existem duas enzimas principais envolvidas neste processo, a ACC sintetase (ACCS) e a ACC oxidase (ACCO), que são codificadas por famílias multigênicas. A enzima ACCO cataliza a última etapa da biossíntese do etileno. A metodologia *antisense* tem sido empregada nos programas de melhoramento genético com relativo sucesso. Ela pode ser utilizada para neutralizar a ação da enzima ACCO, inibindo a formação do etileno, retardando o processo de senescência e maturação de frutos e folhas (SILVA, 2000).

A propagação vegetativa mediante as técnicas de cultivo *in vitro* permite a multiplicação idêntica do genótipo selecionado. Ganhos de produtividade em programas de melhoramento são mais rápidos se a propagação vegetativa for utilizada. De outro lado, a regeneração de brotos através das técnicas de cultura de tecidos é pré-condição para ensaios de inserção de genes em plantas, uma vez que a regeneração é realizada a partir dos tecidos transformados (TORRES *et al.*, 1998).

O conhecimento da base celular do processo de transformação e o desenvolvimento da Biologia Molecular possibilitaram, além da criação de vetores eficientes, o isolamento e a clonagem de genes marcadores para a seleção das células transformadas e de genes de interesse agrônomo, como os *antisense*. No entanto, diferentes genótipos de uma mesma espécie podem não apresentar a mesma resposta em cultura de tecidos e a eficiência com que respondem aos protocolos de transformação pode variar bastante. Com isso, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de regeneração para diferentes genótipos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) visando, posteriormente, a transformação genética dessa espécie. Os objetivos específicos foram: i) regenerar plantas a partir de explantes foliares de plantas jovens oriundas de sementes e de plantas adultas de três genótipos de maracujá, utilizando para isso meios de cultura e reguladores de crescimento específicos; ii) introduzir o gene quimérico nopalina sintase (nos)/neomicina fosfotransferase II, (*nptII*), que confere resistência à canamicina, como um experimento controle da transformação de maracujá-amarelo via *Agrobacterium tumefaciens*; iii) introduzir cópias do gene *MEL 1*, que codifica a enzima ACCO do melão, em orientação *antisense*, em tecidos de maracujá-amarelo, mediante a utilização de

Agrobacterium tumefaciens; iv) estudar a presença do gene externo nas plantas transformadas, v) avaliar a produção de etileno em frutos comerciais de maracujá-amarelo; vi) avaliar a atividade enzimática da ACCO em frutos de maracujá.

Como hipóteses temos que é possível regenerar plantas a partir de tecidos, e este processo é fundamental para a inserção de genes em plantas, uma vez que é a partir da regeneração de tecidos transformados que se obtém plantas transformadas. Células de folhas jovens, quando cultivadas em meios de cultura que contém concentrações definidas de reguladores de crescimento, apresentam a particularidade de se rediferenciar em novos órgãos, originando uma nova planta. Também é possível transformar tecidos de folhas utilizando como vetor *Agrobacterium tumefaciens*, técnica utilizada com sucesso para diversas espécies. No presente trabalho, o gene de interesse é o *antisense* para a enzima ACCO, responsável pela inibição da rota biossintética do etileno, promovendo um atraso no processo de maturação e senescência dos frutos, o que torna esta tecnologia importante na redução dos danos causados aos frutos de maracujá pela colheita, transporte e armazenamento. O conhecimento da produção de etileno e da atividade enzimática da ACCO, é de extrema importância para esclarecer o funcionamento do processo de maturação dos frutos nesta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MARACUJAZEIRO

Maracujá é uma denominação indígena, de origem tupi, que significa “alimento em forma de cuia”. Os maracujás pertencem à família Passifloraceae e também são conhecidos como flor-da-paixão, porque a morfologia da flor sugere uma correlação com os símbolos da Paixão de Cristo. Esta família está amplamente distribuída na região dos trópicos, existindo mais de 580 espécies, a maioria habitante da América tropical e, principalmente, nativa do Brasil. É composta por 12 gêneros. Destes, o gênero *Passiflora* é o que apresenta maior número de espécies, aproximadamente 400. O maior centro de distribuição geográfica desse gênero localiza-se no Centro-Norte do Brasil, o que garante uma ampla variabilidade genética a ser estudada (SOUSA e MELETTI, 1997).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, semilenhosa, perene, mas com duração de 3 a 6 anos em pomar comercial. Apresenta um caule cilíndrico ou anguloso quando jovem. Ela é vigorosa, de crescimento e frutificação precoce; a maioria de suas raízes estão concentradas na profundidade entre 0 e 45 cm, sendo formadas principalmente por raízes grandes. Seus ramos são semi-flexíveis, trepadores, apresentam uma coloração vermelha-purpura ou roxa e sustentam as folhas, gavinhas, flores e frutos, sendo que em cada nó forma-se um novo ramo, uma gavinha, uma flor e o fruto. Formam um grande número de folhas, subcoriáceas, lustrosas na face superior (adaxial), de cor verde escuro, sendo a folha jovem de forma ovada e sem apresentar os três lobos, mas a folha mais velha é profundamente trilobada, com bordos serrados, em cujas axilas nascem as longas gavinhas caulinares. O pecíolo tem dois nectários ou glândulas curtas perto da inserção com a lâmina. Apesar da atratividade das flores e do interesse despertado entre os botânicos, os conhecimentos sobre a citologia de *Passiflora* permanecem limitados. As espécies de maior importância hortícola, como *P. edulis* e outras, tem $2n=18$ cromossomas (JOSÉ *et al.*, 1997).

Esta cultura se desenvolve bem em regiões com altitude entre 100 e 900 metros, tropicais e sub-tropicais, temperatura média em torno de 20 °C a 32 °C, umidade relativa baixa e precipitação em torno de 800 a 1.700 mm bem distribuídos ao longo do ano. Para que ocorra o florescimento e a frutificação é necessário calor, umidade no solo e dias longos. A exigência de um mínimo de 11 horas de luz por dia associada à alta temperatura

para florescer, acarreta o período de entressafra observado no centro-sul do país. As plantas desenvolvem-se bem em diferentes tipos de solo, onde os mais indicados são os arenosos ou levemente argilosos, profundos e bem drenados (LIMA *et al.*, 1994; SOUSA e MELETTI, 1997).

Muitas das espécies de *Passiflora* são cultivadas pelas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos (JOSÉ *et al.*, 1997).

Os frutos, além de consumidos *in natura*, são usados para preparar sucos, doces, refrescos e sorvetes. O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes da passiflorina, um sedativo natural encontrado nos frutos e folhas. Além disso, é utilizado como vermífugo, possui efeitos diuréticos, hipnóticos e abortivos para o gado. No Brasil, as espécies com maior expressão comercial são a *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) a *P. edulis* (maracujá-roxo) e a *P. alata* (maracujá-doce), sendo o maracujá-amarelo o mais conhecido, amplamente cultivado e comercializado de norte a sul do país. O maracujá para processamento industrial é comercializado a granel ou em sacos de náilon. A comercialização do suco representa cerca de 90% do mercado consumidor de maracujá, possuindo o maior rendimento industrial quando comparado com o maracujá processado como polpa, geléia e néctar (SOUSA e MELETTI, 1997).

2.2 A BIOTECNOLOGIA APLICADA À CULTURA DO MARACUJAZEIRO

A biotecnologia pode ser definida como a associação de técnicas sofisticadas de biologia molecular e celular, engenharia genética e manipulações celulares *in vitro*. Dentre as muitas aplicações destas técnicas destacam-se a transferência de genes de organismos diferentes para incorporação de características como resistência a pragas, patógenos e a estresses abióticos, no genoma de uma determinada planta. Quando associadas aos procedimentos da cultura de tecidos, estas técnicas permitem a propagação rápida e massal de genótipos superiores estáveis e isentos de doenças. Desta forma, um dos principais benefícios da cultura de tecidos vegetais para o melhoramento de plantas perenes refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética por meio da propagação clonal (TORRES *et al.*, 1998).

A cultura de tecidos pode ser definida como o cultivo de todos os tipos de células, tecidos e órgãos da planta, sob condições assépticas (SMITH e DREW, 1990). Ou, em um sentido restrito, como um processo mediante o qual pequenos fragmentos de tecido vivo são

isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em um meio nutritivo (MANTELL *et al.*, 1994). Este processo está baseado na totipotencialidade dos explantes, ou seja, no princípio de que cada célula vegetal possui o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro, o que o torna uma ferramenta poderosa para a propagação massal de genótipos superiores (TORRES *et al.*, 1998). Além disso, as técnicas de cultura de tecidos permitem uma multiplicação mais rápida quando comparadas às demais técnicas de propagação assexuada, além de constituir um pré-requisito para futuros estudos de engenharia genética (LACORTE, 1991).

A multiplicação do maracujazeiro em escala comercial é feita quase que exclusivamente por sementes. Apesar de ser este o método convencional de multiplicação da cultura sem um cultivar definido, não há fornecedores comerciais de sementes. Não existe ainda garantia de um alto padrão de homogeneidade ou qualidade. O mesmo ocorre com relação à aquisição de mudas formadas, uma vez que a maioria delas não possui controle da origem das sementes utilizadas (SOUSA e MELETTI, 1997).

Outra dificuldade encontrada para a propagação desta cultura é que o maracujá apresenta auto-incompatibilidade, acarretando a incapacidade de produzir sementes, quando polinizado com o próprio pólen. A auto-incompatibilidade é muito freqüente na natureza. No entanto, ela se torna menos freqüente na natureza, em função da pressão de seleção contrária, causada pela domesticação (LIMA *et al.*, 1994).

Em razão destas dificuldades, a cultura de tecidos pode ser considerada como um processo alternativo e uma importante ferramenta auxiliar no melhoramento desta espécie. Espécies de *Passiflora*, a princípio, não se mostram recalcitrantes à cultura *in vitro* e respondem bem à aplicação de reguladores de crescimento, já sendo possível fechar o ciclo de micropropagação, que compreende o isolamento de explantes, multiplicação, enraizamento e transplântio para a condição *ex vitro* (SILVA, 1998).

A propagação clonal *in vitro* de *Passiflora* foi descrita pela primeira vez por NAKAYAMA (1966), que obteve a proliferação de gemas axilares de *P. caerulea* e por MORAN ROBLES (1978) que, através da utilização de cinetina e AIA, obteve a multiplicação de gemas axilares de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Alguns métodos de propagação *in vitro* de maracujá são utilizados com benefícios consideráveis. A multiplicação clonal de plantas com elevado potencial de rendimento ou resistentes a doenças é alvo de interesse nos programas de melhoramento, assim como a hibridização somática e a manipulação gênica. Para isso, a regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos é necessária (MANDERS *et al.*, 1994).

Sabe-se que certos tecidos são mais favoráveis à regeneração do que outros. A

geração de novos órgãos ou organogênese nos tecidos em cultura pode ser controlada através da introdução exógena de reguladores de crescimento e substratos diversos. A retirada de um pedaço de tecido de um organismo íntegro e sua colocação em um meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento, traz como consequência a liberação de suas células do controle a que estavam submetidas nesse organismo, expondo-as a uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida, fenômeno chamado desdiferenciação, e o genoma pode expressar-se de novas formas, conduzindo estas células a novos padrões de diferenciação. Tais eventos levam à formação de novas estruturas organizadas, em um processo morfogenético ou organogenético que ocorre “de novo” (HANDRO e FLOH, 1990).

Os reguladores de crescimento são uma classe de sinais químicos endógenos, que são facilmente transportados para células responsivas, onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica em nível de transcrição ou de tradução, em um grande número de processos. Estas células responsivas são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao regulador de crescimento e subseqüentemente iniciam a resposta na célula. Estes receptores estão localizados nas membranas, no citoplasma e no núcleo e são, na maioria dos casos, de origem protéica (GUERRA *et al.*, 1998).

Outros fatores como o tipo de explante, a idade fisiológica do explante, a época do ano em que é feita a coleta, a espécie, variedade e cultivar, o estado fisiológico da planta, os componentes nutricionais do meio de cultura, a temperatura e luz, também afetam o processo da morfogênese, que é resultante da divisão e diferenciação organizada, com padrões definidos e que depende da atividade e expressão de sistemas gênicos múltiplos (GUERRA *et al.*, 1998; SCHUCH, 2000).

2.2.1 Regeneração de gemas em maracujá

O crescimento de tecidos adultos de *Passiflora* é difícil de ser obtido *in vitro* e o sucesso descrito até hoje resulta de vários anos de experimentos (DREW, 1991). Muitas vezes são associadas ao experimento outras condições para o desenvolvimento dos explantes, como a ausência de luz por um determinado tempo (FERRADINI *et al.*, 1996).

Assim como a idade fisiológica, o tipo de explante também afeta o padrão de desenvolvimento nos cultivos *in vitro*. Geralmente, na regeneração de plantas lenhosas, os explantes mais utilizados são folhas e entrenós, que precisam ser seccionados para que haja uma proliferação celular com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa

atividade meristemática. Folhas jovens, recém expandidas, são mais responsivas do que folhas velhas e a parte mediana da folha é mais prolífica do que as laterais. Também a posição do explante no meio de cultura é importante. Alguns trabalhos em macieira demonstram que a regeneração a partir de explantes foliares ocorre somente quando a superfície adaxial fica em contato com o meio de cultura (De BONDT, 1995; SCHUCH, 2000).

O efeito do escuro e do tipo de tecido utilizado foram demonstrados para o maracujá em um trabalho realizado por DREW (1991) onde a incubação no escuro estimulou a produção de gemas adventícias de *P. caerulea* na presença de cinetina e aumentou o início do enraizamento em três dos cinco meios testados com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tecidos adultos não responderam ao cultivo *in vitro* em meios basais contendo concentrações menores que 10 μM dos reguladores de crescimento. O crescimento de segmentos nodais isolados de plantas adultas foi obtido com um tratamento destes tecidos no escuro por uma semana em meio MS suplementado com 3 mg.L^{-1} de 2iP, 3 mg.L^{-1} de sulfato de adenina e 3 mg.L^{-1} de AIA. O desenvolvimento em brotos ocorreu em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2iP e 1 mg.L^{-1} de AIA. Em contraste, o cultivo de tecidos juvenis de sete espécies de *Passiflora* foi obtido sem nenhuma dificuldade. Brotos juvenis destas espécies cresceram rapidamente em meio MS suplementado com 2,15 mg.L^{-1} de cinetina e 0,98 mg.L^{-1} de AIA. A multiplicação destes brotos foi obtida em meio de cultura contendo 4,5 mg.L^{-1} de BAP, 2,15 mg.L^{-1} de cinetina e 0,98 mg.L^{-1} de AIA. Raízes foram desenvolvidas em meio de cultura MS com 0,98 mg.L^{-1} de AIA.

A organogênese direta de *Passiflora* foi obtida em um experimento que utilizou como explantes folhas, cotilédones, hipocótilos e raízes de plantas jovens. Foi empregado o meio de cultura MS contendo concentrações de 0, 1 e 2 mg.L^{-1} de ANA e 0; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L^{-1} de BAP. Para o enraizamento foi utilizado o meio de cultura MS, com a concentração de sais reduzida à metade, e 15 g.L^{-1} de sacarose. O melhor resultado de regeneração utilizando cotilédones e hipocótilos foi obtido em meio de cultura MS contendo 2 mg.L^{-1} de BAP. Por outro lado, os explantes foliares responderam melhor em meio de cultura MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP. Estes resultados indicaram uma taxa de regeneração de 66,7% para explantes cotiledonares, 33,3% para explantes hipocotiledonares e 41,7% para explantes foliares (DORNELAS e VIEIRA, 1994).

Folhas jovens também foram utilizadas como explantes por KAWATA *et al.* (1995) para a micropropagação de *P. edulis* Sims. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e AIB. Em concordância com outros trabalhos, foi observado que as melhores taxas de regeneração foram obtidas

quando se utilizou concentrações de 1 a 2 mg.L⁻¹ de BAP, sem a utilização de auxinas como o AIB. Neste experimento constatou-se que o melhor meio de cultura para o enraizamento das plântulas regeneradas, foi o MS sem adição de qualquer regulador de crescimento.

Um protocolo para a micropropagação de maracujá – amarelo foi estabelecido, a partir da proliferação de gemas axilares, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP. Surpreendentemente não foram obtidas diferenças significativas entre o tratamento controle e os demais, com 0,45 mg.L⁻¹, 1,13 mg.L⁻¹ e 4,5 mg.L⁻¹ de BAP (FARIA e SEGURA, 1997). A presença de 0,35 mg.L⁻¹ de AIA no meio de indução de gemas, não afetou a porcentagem de regeneração ou o número médio de brotos por explante, resultado semelhante àquele obtido por KAWATA *et al.* (1995).

Resultados também foram obtidos para a regeneração de gemas, a partir de segmentos internodais de plantas jovens de maracujá-amarelo, utilizando o meio básico MS suplementado com 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP. O crescimento e enraizamento das gemas adventícias foram obtidos em meio de cultura MS, com a concentração de sais reduzida à metade, e sem reguladores de crescimento (BIASI *et al.*, 2000).

A cultura *in vitro* em maracujá também foi aplicada em outros estudos que utilizaram explantes de híbridos. Um exemplo disso foi o trabalho realizado por FREITAS (1997) que utilizou micro-estacas caulinares com gemas apicais de híbridos F₁ obtidos do cruzamento entre *P. edulis* e *P. edulis f. flavicarpa*. As brotações formaram-se a partir das gemas apicais cultivadas em meio de cultura MS com 0,9 mg.L⁻¹ de AIA, 2,2 mg.L⁻¹ de cinetina, 4,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de GA₃. Quanto ao enraizamento, a melhor porcentagem foi obtida com o meio básico MS com a concentração de sais e vitaminas reduzida à metade.

2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

As agrobactérias são microorganismos tipicamente do solo, aeróbicas e gram-negativas. O gênero *Agrobacterium* pertence à família Rhizobiaceae e está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas. Assim, *Agrobacterium tumefaciens* é o patógeno causador da doença chamada galha - da - coroa, *Agrobacterium rhizogenes* causa a raiz - em - cabeleira, *Agrobacterium rubi* induz tumores especificamente em *Rubus* spp., *Agrobacterium vitis* induz tumores especificamente em videiras e *Agrobacterium radiobacter* é saprófita, ou seja, não patogênica. Mais de 600 espécies vegetais são suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, sendo que a maior parte delas pertence à classe das

angiospermas dicotiledôneas e gimnospermas e, mais raramente, das angiospermas monocotiledôneas (BRASILEIRO, 1998).

A interação entre *A.tumefaciens* e as plantas envolve uma série complexa de sinais químicos existentes entre o patógeno e o hospedeiro. Estes sinais incluem açúcares, compostos fenólicos, opinas, proteínas de virulência e o T-DNA, isto é, o DNA que é transferido da bactéria para a célula vegetal. Este processo de infecção inicia quando *Agrobacterium* percebe certos compostos fenólicos e açúcares que são liberados pelas células das plantas hospedeiras em resposta a uma lesão sofrida pela planta. Estes compostos fenólicos atuam como indutores dos genes de virulência da bactéria. Desta forma, a *Agrobacterium* usa estes compostos para sinalizar a presença de plantas potencialmente suscetíveis (GELVIN, 2000).

As células produzidas naturalmente pela *Agrobacterium* proliferam-se de forma autônoma na ausência de reguladores de crescimento. Sabe-se que auxinas e citocininas são necessárias para o desenvolvimento de células de uma planta normal. *In vitro* estas células produzidas pela *Agrobacterium* crescem de forma desorganizada e formam calos, quando os reguladores de crescimento estão ausentes no meio de cultura. Estas células produzem e excretam aminoácidos e açúcares que não são formados pelas células de plantas normais. Um dos primeiros compostos foi caracterizado como octopina, um produto formado pela condensação da arginina com o ácido pirúvico. Hoje, estes compostos são denominados de opinas e são utilizados pela *Agrobacterium*, como fonte de energia, carbono e nitrogênio, sendo desta forma, compostos químicos intermediários do parasitismo. O tipo de opina produzido é usado como critério de classificação de linhagens de *Agrobacterium* (SHENG e CITOVSKY, 1996).

Os sinais químicos também chamados moléculas-sinal ativam genes localizados na região de virulência do plasmídeo Ti (indutor de tumor), que é um plasmídeo extra-cromossomal de alto peso molecular (150 a 250 Kb, isto é, aproximadamente 150 a 250 mil pares de bases), presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium*. A região *vir* é um *regulon* composto de seis a oito *operons*, contendo aproximadamente 25 genes. As diferentes proteínas codificadas por estes genes *vir* promovem a transferência de uma outra região do plasmídeo Ti da bactéria para a célula vegetal. Esta região é conhecida como T-DNA, que é efetivamente transferida e integrada no genoma da planta durante o processo de transformação e uma ou mais cópias são integradas ao acaso. Esta região está delimitada por duas seqüências repetidas de 25 pb (pares de base), denominadas de extremidades direita e esquerda. A borda direita é considerada necessária para a eficiência da transferência de DNA, ao passo que a borda esquerda pode ser dispensada ou

substituída por outra borda direita, ou mesmo por uma borda sintética. Infectividade e virulência são determinadas pelos genes *vir* (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir F* e *vir G*). A formação de tumores depende dos genes *vir A*, *vir B*, *vir D* e *vir G*. Presume-se que os demais estejam ligados à eficiência da transferência de DNA. Estes genes são capazes de detectar células vegetais feridas e de produzir os sinais necessários para o desencadeamento da produção dos intermediários do T-DNA, e das proteínas ligadas à fixação das células bacterianas às células vegetais e à passagem do DNA para as células vegetais (SHENG e CITOVSKY, 1996; BRASILEIRO e LACORTE, 1998).

A região *vir* de 40 Kb do plasmídeo Ti do tipo octopina possui 24 genes que estão envolvidos na virulência. Esses genes estão presentes em oito *operons* chamados *vir A-H*, os quais são co-regulados e formam assim um *regulon*. Com exceção dos genes *vir A* e *vir G*, que tem expressão constitutiva, os *operons vir* não são transcritos durante o crescimento vegetativo normal (HOOYKAAS e SCHILPEROORT, 1992).

Após a indução dos genes *vir*, ocorre a clivagem do T-DNA no plasmídeo, formando-se uma espécie de fita simples de DNA, sendo apenas uma cópia por célula de *Agrobacterium*. O *operon vir D* codifica uma endonuclease que age em sítios específicos e que é responsável pela clivagem e proteção do DNA contra a degradação enzimática. *Vir D₂*, produto do *operon vir D*, serve como proteína piloto para guiar a fita T da bactéria para o interior da célula vegetal. *Vir E₁* e *vir E₂*, produtos do *operon vir E*, atuam na estabilidade do T-DNA. O locus *vir A* codifica uma proteína de membrana que reconhece compostos fenólicos liberados pelas células da planta ferida. O locus *vir G* produz uma proteína responsável pela ativação da região *vir* restante. A transferência do T-DNA é polar (5'-3'), fita simples, com a extremidade 5' protegida pela proteína *vir D₂* e ao longo da fita, pela proteína *vir E₂* (SCHRODER *et al.*, 1984; THOMASHOW *et al.*, 1984; SHENG e CITOVSKY, 1996; GELVIN, 2000).

Três componentes genéticos das agrobacterias são necessários para que ocorra a transformação da célula vegetal. Além do T-DNA e dos genes *vir*, já citados, existe um terceiro componente, os genes *chv*, localizados no cromossoma da agrobactéria (SHENG e CITOVSKY, 1996).

Os genes *vir* e *chv* determinam o aparato necessário para a transferência do T-DNA da *Agrobacterium* para as células vegetais. *Chv A* e *Chv B* são necessários para que ocorra a ligação da agrobactéria às paredes da célula vegetal. Os genes *chv* são expressos constitutivamente, enquanto que os genes *vir* são silenciosos até serem induzidos por fatores como a acetossiringona, composto fenol liberado pelo tecido vegetal em resposta a um ferimento (HOOYKAAS e SCHILPEROORT, 1992).

Para que a *Agrobacterium tumefaciens* possa ser utilizada na engenharia genética, é necessário fazer algumas modificações no seu genoma. Os genes responsáveis pela formação dos tumores, que se encontram no plasmídeo Ti são removidos, tornando a bactéria avirulenta, não sendo mais capaz de formar o tumor. O preparo de uma linhagem de *Agrobacterium* para ser utilizada como vetor no processo de transformação de plantas inclui duas etapas distintas. Na primeira, é preciso obter as linhagens desarmadas, nas quais o T-DNA original com os oncogenes foi retirado. A escolha da linhagem mais apropriada para a transformação de uma determinada espécie deve levar em conta sua susceptibilidade e a virulência da linhagem selvagem. Já existem disponíveis algumas destas linhagens desarmadas. A segunda etapa envolve o preparo de um vetor contendo o T-DNA com os genes de interesse. Em função do seu tamanho relativamente grande (aproximadamente 200 Kb), o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Assim, plasmídeos menores (vetores) são utilizados. Esses vetores contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais os genes de interesse são clonados. Tais vetores podem ser do tipo binário ou co-integrado. O sistema de vetor binário tem sido o mais utilizado, pois a eficiência na obtenção de linhagens recombinantes de *Agrobacterium* é cerca de 100 vezes maior do que o obtido pelo sistema de vetor co-integrado. Além disso, podem ser utilizados em qualquer linhagem de *Agrobacterium* (HOEKEMA *et al.*, 1983; LACORTE e ROMANO, 1998). Uma terceira etapa ocorre e facilita a integração da *Agrobacterium* na célula vegetal. Consiste no processo de co-cultivo de um explante vegetal em um meio de cultura líquido e/ou sólido, juntamente com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* que contenha um vetor com o (s) gene (s) a ser (em) introduzido (s) na planta. Durante o co-cultivo ocorrerá a ligação entre a bactéria e a célula vegetal no local do ferimento do explante, a indução dos genes da região de virulência e a transferência do T-DNA para o genoma vegetal (BRASILEIRO, 1998).

2.3.1 Genes marcadores e repórteres

A incorporação de outros genes no plasmídeo desarmado é de extrema importância, uma vez que atuarão no processo de seleção das plantas transformadas. Conhecidos como genes repórteres, eles codificam proteínas, geralmente de atividade enzimática, cujos produtos são facilmente detectáveis nas células vegetais transformadas. Estes produtos não devem estar presentes nas células normais, isto é, não transformadas. Um exemplo deste gene é o *gusA* ou *uidA*, isolado de *Escherichia coli*, e que codifica a enzima hidrolase β -

glucuronidase (GUS) (LACORTE,1991).

Outros genes, denominados marcadores de seleção, codificam para uma proteína com atividade enzimática ou para um produto que irá conferir resistência a um determinado substrato nas células transformadas, o que permite distinguir plantas transformadas de não transformadas (BRASILEIRO e DUSI, 1999). O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para uma eficiente recuperação *in vitro* de plantas transgênicas. O marcador confere caráter dominante às células transformadas, resultante da incorporação de uma nova característica, que não está presente nas células não transformadas. Essa característica permite a sobrevivência da célula vegetal transformada na presença de um agente de seleção, geralmente um antibiótico ou herbicida. O marcador de seleção mais utilizado é o gene *nptII*, que codifica a neomicina fosfotransferase II ou NPT II. Este gene foi isolado do transposon Tn5 de *Escherichia coli* e foi o primeiro a ser introduzido em plantas. A enzima NPT II transfere o grupamento γ fosfato de ATP para um grupo 3-hidroxil da porção amino-hexose dos antibióticos aminoglicosilados. Um exemplo destes é o antibiótico canamicina (Km), que é detoxificado por fosforilação. Quando ativos, esses antibióticos inibem a síntese de proteínas nas células procariotas, ligando-se às subunidades 30S e 50S dos ribossomos, impedindo o processo de tradução. Na célula vegetal eles interferem do mesmo modo na síntese protéica em mitocôndrias e cloroplastos, que possuem ribossomos semelhantes aos das bactérias, resultando em clorose e inibição do crescimento do tecido vegetal. Desta forma, as plantas transgênicas que expressam a enzima NPT II toleram dosagens tóxicas destes antibióticos, ao passo que nas plantas não transformadas, são letais (BRASILEIRO, 1998).

2.3.2 Identificação da planta transformada por PCR

O próximo passo após a construção do vetor e sua inserção na linhagem desarmada de *Agrobacterium* é o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração, transformação, seleção e identificação da planta transformada. A identificação das plantas transformadas pode ser feita a partir do método "PCR" (reação da polimerase em cadeia), onde, a partir de uma única molécula de DNA, é possível gerar 100 bilhões de moléculas similares em poucas horas (HORSCH *et al.*, 1985; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

PCR pode ser definido como um método *in vitro* para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e seqüência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico. A reação de amplificação é

catalisada pela enzima DNA polimerase, que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado primer, quando este está ligado a uma fita molde de DNA. O método inicia com a separação das fitas do DNA molde através de uma reação de desnaturação, em função de temperatura elevada. A temperatura é então diminuída para que ocorra o anelamento dos iniciadores com o DNA molde e a enzima polimerase possa atuar, estendendo um novo fragmento. Os segmentos de DNA são sintetizados em progressão geométrica, pois a cada ciclo de desnaturação, anelamento e polimerização, origina-se um novo segmento (GAMA, 1998).

2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM MARACUJÁ

MANDERS *et al.* (1994) foram os primeiros a relatar um trabalho de transformação de maracujá-amarelo, com material juvenil, utilizando uma estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo vetor pMON 200 e o gene *nptII*.

SILVA (1998) realizou um trabalho para esta mesma espécie, com material juvenil, com o objetivo de adequar o sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium* e analisar a interação do antibiótico canamicina na morfogênese de ramos e no enraizamento *in vitro*. A autora obteve respostas morfogênicas até a concentração de 100 mg.L⁻¹ de Km, após 30 dias de cultivo, sendo que os explantes mantiveram-se verdes e com esporádicas regiões de regeneração. Altas concentrações de Km, 150 e 200 mg.L⁻¹ inibiram completamente a rizogênese. Foi obtida uma eficiência de transformação de 2%. Segundo a autora, a adoção de meios de seleção suplementados com antibióticos em concentrações elevadas, não é a melhor estratégia para eliminar células ou tecidos não-transformados, uma vez que a pressão de seleção imposta pode inibir a diferenciação de células transgênicas.

O maracujá-amarelo é considerado uma espécie de nível intermediário de tolerância natural ao antibiótico canamicina, sendo que existem diferenças significativas tanto fisiológicas como anatômicas entre plantas de maracujá submetidas à diferentes concentrações de Km, cultivadas em climas tropical e temperado (MANDERS *et al.*, 1994).

2.5 TÉCNICA DO RNA *antisense*

O DNA recombinante pode ser construído com a inserção de um fragmento de DNA

exógeno em uma pequena molécula replicante, como um plasmídeo bacteriano, que irá amplificar o fragmento juntamente com ele mesmo, resultando em um clone molecular do fragmento de DNA inserido, cDNA, que consiste de uma fita simples do DNA, complementar à molécula do RNA, sintetizado *in vitro* a partir de RNA, pela ação da enzima transcriptase reversa. A alteração de características genômicas tem sido alcançada através da técnica de mRNA *antisense*. A introdução de uma sequência complementar ao mRNA do gene de interesse resulta no bloqueio da sua atividade gênica. O mRNA *antisense* hibridiza com o mRNA primário, bloqueando o processo de tradução e resultando na sua degradação (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Esta técnica tem sido utilizada na inibição de rotas bioquímicas indesejáveis, determinação da função da regulação gênica em estudos bioquímicos e identificação de genes com expressão fenotípica conhecida, mas que não possuem marcadores moleculares (BORÉM, 1997).

A geração de plantas nas quais a produção de etileno é inibida pela inserção de clones de DNA em orientação *antisense*, é um dos exemplos desta técnica e oferece a oportunidade de avaliar o papel deste gás na regulação de alguns processos de desenvolvimento da planta como a senescência e abscisão foliar, maturação e resposta a patógenos, além de permitir a manipulação genética das mesmas, melhorando a qualidade, período de armazenamento e valor nutricional dos produtos (HAMILTON *et al.*, 1990).

2.6 ETILENO

O etileno é um hidrocarboneto gasoso (C₂H₄), que atua como fitohormônio, desempenhando um importante papel na regulação do processo deteriorativo intrínseco da planta. Ele controla muitos estádios do desenvolvimento da planta, tais como maturação de frutos climatéricos, senescência de folhas e flores. Sua síntese autocatalítica é fortemente estimulada por fatores exógenos como infecções fúngicas e/ou bacterianas, injúrias mecânicas, estresses hídrico, térmico e salino e também outros fitohormônios (BOUZAYEN *et al.*, 1997; THEOLOGIS *et al.*, 1992; ZIMMER, 1998).

No que se refere ao processo de maturação, os frutos são classificados em dois grupos: climatéricos e os não-climatéricos. No processo de maturação dos frutos climatéricos ocorre um aumento significativo na taxa respiratória e na produção de etileno. São exemplos de frutos climatéricos as maçãs, pêras, maracujás, ameixas, tomates, pêssegos, dentre outros (KADER, 1989).

Todos os frutos climatéricos sintetizam etileno no início da maturação e este fitohormônio induz a expressão de genes responsáveis pelos atributos qualitativos do fruto. Alterações na cor do fruto podem ocorrer pela perda de clorofila nos plastídios, manifestando carotenóides amarelos, alaranjados ou vermelhos. Alterações na textura estão frequentemente associadas com alterações nos componentes da parede celular. Enzimas como poligalacturonase, celulase e galactanase estão envolvidas neste processo. A característica geral é que estas enzimas promovem alterações estruturais nos polímeros da parede celular, que alteram a solubilidade, hidratação e outras propriedades que influenciam na textura. Outros metabólitos são gerados a partir de aminoácidos, carotenóides ou lipídios e contribuem para a qualidade do aroma e sabor. Muitas destas alterações na estrutura da parede celular, são dependentes da transcrição de genes envolvidos na maturação e que codificam enzimas específicas. Além disso, existem diferenças significantes nestas enzimas de acordo com os diferentes frutos existentes (GRIERSON, 1998).

2.6.1 Biossíntese do etileno

A via de biossíntese do etileno foi descrita por YANG e HOFFMAN (1984). O aminoácido metionina é o precursor biológico do etileno em todas as plantas superiores, e é convertido em etileno pela via de biossíntese que compreende dois passos com reações enzimáticas. Na primeira reação, a S-adenosil-metionina (SAM) é convertida em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintetase (ACCS). A ACC é então metabolizada pela ACCO, por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro, e que é ativada pelo CO₂ para produzir etileno. Outra importante reação é o chamado ciclo de Yang, que recupera o enxofre e re-sintetiza a SAM. Em alguns casos, o etileno regula sua própria produção, induzindo a síntese de novo da ACCS e ACCO. O ACC, precursor imediato do etileno, pode ser convertido ainda em malonil-ACC sob ação da enzima N-maloniltransferase (NMT) e então transportado nessa forma para os vacúolos (Figura 1) (GRIERSON, 1998; THEOLOGIS *et al.*, 1992).

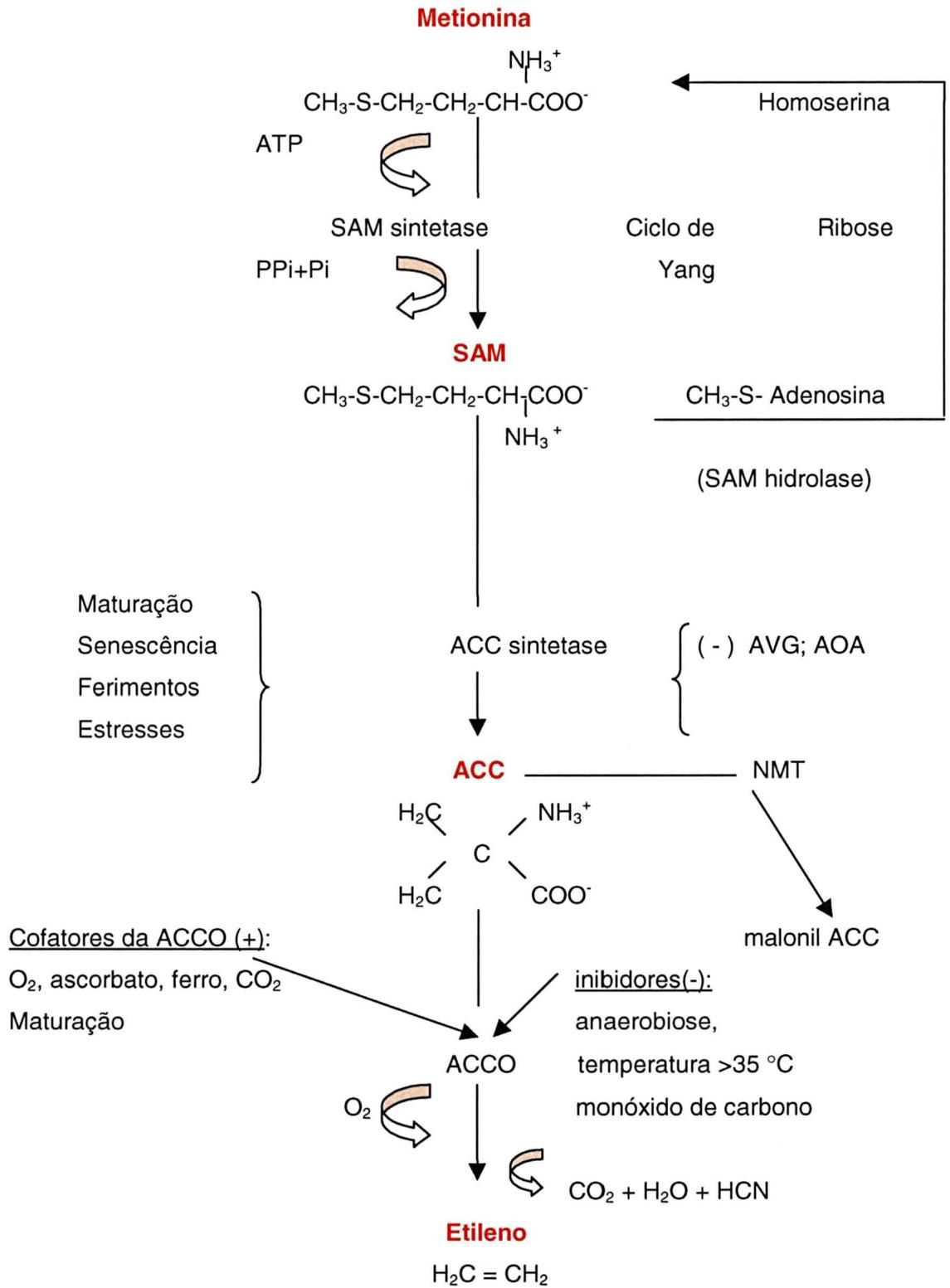


FIGURA 1 - Biossíntese do etileno, adaptado de YANG e HOFFMAN (1984).

ACC= ácido-1-carboxílico-1-aminociclopropano	AVG= aminoetoxivinilglicina
SAM= S-adenosil-metionina	AOA= ácido aminooxaloacético
(+) =ativadores (-) = inibidores	NMT= N-maloniltransferase

2.6.2 Enzimas ACC sintetase e ACC oxidase

Os genes que codificam a ACCS foram isolados e mostram, em muitas espécies, que a ACCS é codificada por uma família multigênica. Cada gene é diferentemente regulado por um ou vários indutores, como auxinas, injúrias mecânicas e/ou etileno (SILVA, 2000).

A maior parte dos trabalhos de modificação genética de frutos tem sido realizada em tomate (*Lycopersicon esculentum*), isto porque ele apresenta vantagens no que se refere a alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o processo de maturação, entre elas, o ciclo relativamente curto. Existe para o tomate, no mínimo nove genes da ACCS e três para a ACCO (GRIERSON, 1998). Entre estes genes, recentemente isolados, temos o *LE-ACS2* e *LE-ACS4* que não se expressam no fruto verde; os genes transcritos de *LE-ACS2* são acumulados no estágio intermediário, mantendo-se durante a maturação e os genes *LE-ACS4* são acumulados nos estádios mais avançados da maturação (THEOLOGIS *et al.*, 1992; SILVA, 2000).

Resultados positivos foram obtidos em tomate, com a inibição da atividade da ACCO através da técnica de RNA *antisense*. Em plantas que eram homozigotas para o gene *antisense*, a produção de etileno foi inibida em 97% dos frutos. O acúmulo de mRNA nos frutos em maturação e folhas em senescência está correlacionado com a percepção e produção de etileno. No entanto, os mecanismos regulatórios que governam a síntese de etileno e o estímulo para a expressão dos genes pelo etileno ainda não estão completamente elucidados (HAMILTON *et al.*, 1990).

Estudos recentes em frutos como tomate e melão (*Cucumis melo*) permitiram que a ACCS fosse bem caracterizada e os genes respectivos isolados e clonados. Para a ACCO, no entanto, estes estudos ainda tem revelado novas descobertas no que se refere ao seu modo de ação. A ACCO, última enzima na via de biossíntese do etileno, ainda possui sua localização subcelular como ponto de controvérsia. Alguns trabalhos sugerem que a ACCO é uma enzima citosólica e outros acreditam que ela está localizada na periferia da membrana plasmática, provavelmente aderida à resíduos da parede celular (HAMILTON *et al.*, 1990; ROMBALDI *et al.*, 1994; PECH *et al.*, 1995).

A extração e dosagem da atividade da ACCO *in vitro* foi feita por uma analogia entre a ACCO e a enzima flavonona hidroxilase, que necessita de glicerol e ascorbato no tampão de extração, para a preservação da sua atividade enzimática (VERVERIDES e JOHN, 1991). Métodos indiretos de extração permitiram determinar que o O₂, Fe⁺⁺, CO₂ e o ascorbato, são cofatores da ACCO, e que o íon CO⁻ (monóxido de carbono), e choques osmóticos, são capazes de inibir a atividade enzimática da enzima ACCO (PECH *et al.*,

1994; GORNY e KADER, 1997).

A ACCO é codificada por uma família multigênica e se expressa constitutivamente na maioria dos tecidos vegetais, com forte indução na maturação dos frutos, senescência e também em tecidos submetidos a danos físicos, mecânicos ou sob a ação de fungos (SILVA, 2000). Em tomate, três genes foram identificados: *LE-ACO1*, *LE-ACO2* e *LE-ACO3*. O cDNA pTOM13 corresponde ao gene *LE-ACO1*. Os genes representados por *LE-ACO1* e *LE-ACO3* são expressos na maturação e na senescência de folhas e flores. Os genes transcritos correspondentes ao gene *LE-ACO2* são detectados exclusivamente em anteras. A expressão de genes homólogos ao pTOM13 do tomate, também tem sido demonstrada em maçã (*Malus domestica*) e melão (PECH *et al.*, 1995; NAKATSUKA *et al.*, 1997; BOUZAYEN *et al.*, 1997).

Plantas transgênicas de tomate, melão e maçã, nas quais a síntese de etileno é reduzida, já foram produzidas, utilizando genes da ACCO em orientação *antisense*, para inibir o último passo na rota biossintética do etileno, catalizado por esta enzima (HAMILTON *et al.*, 1990; AYUB *et al.*, 1996; GUIZ *et al.*, 1997 a, 1997 b; GRIERSON, 1998; PETERS *et al.*, 1999; SCHUCH, 2000).

Plantas transgênicas de tomate, que continham o gene da ACCO em orientação *antisense* foram analisadas, a fim de determinar o papel do etileno durante o processo de senescência foliar. Os resultados indicaram que o acúmulo de mRNAs da ACCO inicia normalmente nas folhas verdes em senescência, mas foi severamente reduzido em plantas *antisense*. Embora os níveis de etileno tenham aumentado nas folhas do tipo selvagem durante o progresso da senescência, os níveis foram extremamente baixos em folhas transgênicas. Identificada pela alteração da coloração das folhas verdes para amarelas, a senescência sofreu claramente um atraso de 10 a 14 dias nas plantas *antisense*. Além disso, os níveis de clorofila, a capacidade fotossintética e fluorescência da clorofila foram maiores em relação às plantas do tipo selvagem da mesma idade (JOHN *et al.*, 1995).

Em plantas de meloeiro do grupo Cantaloupe, um cDNA, denominado *MEL1*, que codifica a ACCO foi isolado, utilizado em orientação *antisense*, e então denominado *LEM1*, para reduzir o processo de maturação dos frutos pela inibição da atividade enzimática da ACCO. Este clone é homólogo ao pTOM13 do tomate. No meloeiro, a ACCO é igualmente codificada por três genes correspondentes a três proteínas ativas (GUIZ *et al.*, 1996).

A expressão diferenciada destes genes em tecidos de melão foi confirmada em diversos trabalhos. O gene *CMe-ACO2* foi expresso em hipocótilos estiolados. Os genes *CMe-ACO1* e *CMe-ACO3* se expressaram em flores masculinas e hermafroditas, sendo que o *CMe-ACO1* teve maior expressão em flores senescentes e o *CMe-ACO3* em flores

durante a antese. *CMe-ACO1* também foi expresso em folhas e frutos no estágio de maturação. Este gene foi inserido em cultivares de melão do grupo Cantaloupe, via *Agrobacterium tumefaciens* e em orientação *antisense*. Ele reduziu a produção de etileno no fruto transgênico em 99% e 68 % nas folhas. Os frutos transgênicos portando o gene da ACCO em orientação *antisense* apresentaram a inserção de um único locus com duas cópias do T-DNA e serviram como modelo para discriminar entre as etapas do processo de maturação, as que são reguladas pelo etileno e as que são independentes do etileno (PECH *et al.*, 1994; PECH *et al.*, 1995; GUIIS *et al.*, 1996; AYUB *et al.*, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de organogênese e transformação genética foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

3.1 EXPERIMENTOS DE ORGANOGÊNESE

3.1.1 Manutenção das plantas matrizes

Para os experimentos de organogênese foram utilizadas folhas de plantas jovens, com um único lobo, obtidas da germinação de sementes de frutos comerciais de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., crescidas em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná, na cidade de Curitiba, e folhas de plantas adultas, com três lobos e seis meses de idade, dos genótipos 309, 352 e 156 x 123 enxertados e fornecidos pelo IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) (Tabela 1).

As sementes germinaram em vasos plásticos, contendo substrato comercial preparado com NPK, calcáreo e pó-de-xaxim. Aproximadamente 45 dias após a semeadura, antes da emissão de gavinhas, foram coletadas as primeiras folhas jovens que forneceram os explantes.

As mudas obtidas através do IAPAR, foram inicialmente transplantadas para recipientes plásticos com capacidade de cinco litros, contendo três partes de solo para uma parte de esterco curtido. Após sessenta dias, as mudas foram novamente transplantadas para o substrato comercial utilizado anteriormente.

As plantas foram pulverizadas com Benlate 50 ® (benomyl) 2 g.L⁻¹, Acefato Fersol 750 PS ® (acephato) 2 g.L⁻¹ e Dithane PM ® (mancozeb) 1,5 g.L⁻¹ conforme a necessidade de controle dos patógenos.

TABELA 1 - Procedência dos genótipos de maracujá-amarelo, fornecidos pelo IAPAR.

Genótipos	Procedência
352	Ângulo – PR
309	lbaití – PR
156 x 123	Pacaembú – SP x Araguari – MG

3.1.2 Desinfestação e obtenção de explantes

As folhas jovens e adultas foram desinfestadas com etanol 70% por dois minutos e imersas em uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% por dez minutos. Em seguida, foi realizada uma lavagem tripla com água deionizada e esterilizada. Delas, retirou-se as bordas, mantendo-se a nervura central. Cada explante foi constituído por pedaços de aproximadamente 1cm². A inoculação dos tecidos foi realizada em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar.

3.1.3 Meios de cultura e condições de crescimento

O meio básico de cultura utilizado para indução de gemas, alongamento e enraizamento dos brotos foi o MS, contendo sais minerais, vitaminas e compostos orgânicos de MURASHIGE e SKOOG (1962), 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da colocação do ágar. O meio de cultura foi distribuído em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo cada um 30 mL de meio e então autoclavado durante vinte minutos a 1,05 kg.cm⁻² de pressão e 121°C.

Quatro tratamentos foram testados para a indução da organogênese:

- 1) Testemunha;
- 2) 1 mg.L⁻¹ de BAP;
- 3) 1,5 mg.L⁻¹ de BAP;
- 4) 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Para o alongamento e enraizamento das brotações, foram testados dois tratamentos:

- 1) MS;
- 2) MS com a concentração de sais minerais reduzida à metade e suplementado com 1 mg.L⁻¹ de GA₃.

Os experimentos de organogênese e alongamento x enraizamento dos brotos foram realizados em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo "branca fria", de irradiância de 40 μmol.m⁻².s⁻¹, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 26±2°C.

3.1.4 Experimento de organogênese a partir de explantes jovens

Folhas jovens de plantas oriundas de semente comercial foram utilizadas neste experimento. Foram testadas duas posições dos explantes no meio de cultura (abaxial e adaxial) e quatro tratamentos: MS, MS + 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Ao final de trinta dias foram avaliadas as seguintes características: % de explantes com gemas, número médio de gemas por explante, número médio de folhas por explante, comprimento médio das folhas por explante (cm), comprimento da haste principal (cm) e % de explantes que formaram calos.

3.1.5 Experimento de organogênese a partir de explantes adultos

Neste experimento foram utilizadas folhas adultas dos três genótipos fornecidos pelo IAPAR. Foram testadas duas posições dos explantes no meio de cultura (abaxial e adaxial) e os tratamentos com BAP já descritos.

Após trinta dias foram avaliadas as seguintes características: % de explantes com gemas, número médio de gemas por explante, número médio de folhas por explante, comprimento médio das folhas por explante (cm), comprimento da haste principal (cm) e % de explantes que formaram calos.

3.1.6 Experimento de alongamento e enraizamento a partir de explantes jovens e adultos

As brotações desenvolvidas após trinta dias pelo processo de organogênese foram transferidas dos frascos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura MS e MS/2 com 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃. Sessenta dias após a transferência, foram feitas as seguintes avaliações: porcentagem de enraizamento, o comprimento da haste principal (cm), o número de raízes por plântula e o comprimento médio das raízes por plântula (cm).

3.1.7 Delineamentos utilizados e análise Estatística

Os dados foram analisados pelo sistema computacional estatístico SANEST

(Sistema de análise estatística) elaborado no Departamento de Matemática e Estatística da Universidade Federal de Pelotas (ZONTA e MACHADO, 1984).

O delineamento experimental adotado para o experimento de organogênese de explantes jovens foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com quatro repetições e dez explantes por parcela. Os tratamentos foram comparados pela regressão polinomial. Para o experimento de organogênese de explantes adultos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial (2) x (4) x (3). Duas posições dos explantes (face abaxial e adaxial), quatro concentrações da citocinina BAP (0; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e três genótipos (309, 352 e 156 x 123). O número de repetições foi quatro, com dez explantes por parcela, totalizando quarenta explantes por genótipo, por posição e por concentração de BAP. Neste experimento foi realizado o teste de comparação múltipla de médias, Duncan, para posição e genótipos, e uma análise de regressão polinomial para os níveis de BAP. Os dados expressos em porcentagem (porcentagem de explantes com gemas e porcentagem de calos) foram transformados segundo arco seno da raiz de X/100, onde X significa o valor percentual obtido para cada variável. Os dados relativos ao número de gemas por explante e número de folhas foram transformados segundo a raiz quadrada de (X + K), sendo K=0,5.

O delineamento experimental adotado para o experimento de alongamento e enraizamento foi inteiramente casualizado, com trinta repetições por tratamento, onde cada repetição correspondeu a um tubo de ensaio com uma plântula cada.

3.2 EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Foi utilizado o sistema indireto de transformação, onde a bactéria empregada foi *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA101, com genes de resistência ao antibiótico canamicina (Km), e resistência cromossômica à rifampicina (Rif). O plasmídeo foi o pGA643 (AN *et al.*, 1988) de 11,4 kb, que contém o gene da neomicina fosfotransferase II (*nptII*), obtido do transposon Tn5 e que confere resistência ao antibiótico Km, o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (cauliflower mosaic vírus- CaMV) e o terminador T7-5. Esse plasmídeo contém também o gene de resistência à Tc, localizado fora da região do T-DNA. O plasmídeo em *E. coli* foi fornecido pelo Prof. Ricardo Ayub, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

O clone utilizado corresponde ao cDNA da ACCO obtido em melão (*Cucumis melo*) cv. Cantaloupe por AYUB *et al.* (1996) e denominado pMEL1, que foi inserido em orientação

antisense no sítio *BglII*, situado entre o promotor 35S e o terminador T7-5 do plasmídeo pGA643. Esse sítio de restrição é o sétimo da região de multiclonagem. Esta construção denominada pGA643-AS tem 12,8 kb, cuja região T-DNA está representada esquematicamente na Figura 2.

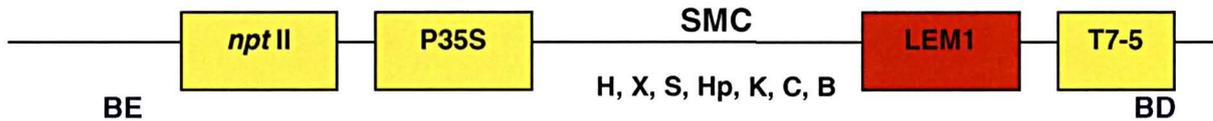


FIGURA 2 - Esquema geral de região T-DNA do pGA643 contendo o cDNA da ACCO em orientação *antisense*. BE: borda esquerda; *npt II*: neomicina fosfotransferase II; P35S: promotor 35S do CaMV; SMC: sítio de multiclonagem (H-*HindIII*, X-*XbaI*, S-*SacI*, Hp-*HpaI*, K-*KpnI*, C-*Clal*, B- *BglII*); LEM1: clone da ACCO do melão em orientação *antisense*; T7-5: terminador do plasmídeo Ti; BD: borda direita.

3.2.1 Transferência do plasmídeo pGA643 de *Escherichia coli* para a cepa de *Agrobacterium*.

Realizou-se uma conjugação triparental, um dos métodos mais simples para a transferência de plasmídeos de *E. coli* para *Agrobacterium* (BRASILEIRO, 1998). A linhagem Helper (pRK2013) fornece as funções de mobilização e transferência de plasmídeos entre bactérias compatíveis. Já a linhagem doadora contém o vetor binário que deverá ser transferido, neste caso, o plasmídeo pGA 643 com o gene *antisense* da enzima ACCO. Durante a conjugação, o plasmídeo Helper foi transferido para a linhagem doadora e a seguir, promoveu sua mobilização e a do vetor para a cepa EHA101 (receptora).

O meio de cultura utilizado para o cultivo da bactéria foi o YEB (VERVLIET *et al.*, 1975) líquido e sólido, que contém extrato de levedo, extrato de carne, triptona, sacarose, MgSO₄ e ágar (quando sólido).

A bactéria obtida da conjugação foi mantida na geladeira a 4°C e repicada a cada trinta dias para um novo meio YEB sólido. A bactéria foi cultivada com as seguintes concentrações dos respectivos antibióticos: Km 50 mg.L⁻¹; Tc 10 mg.L⁻¹; Rif 50 mg.L⁻¹. Os antibióticos foram preparados em soluções estoque, e esterilizados em filtros Millex- GS (Millipore, USA) com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro, sendo adicionados ao meio de cultura em processo de resfriamento, após a autoclavagem.

3.2.2 Preparo das bactérias para a inoculação em tecido vegetal

Isolou-se uma pequena colônia da bactéria contendo o gene *antisense*, que estava sendo cultivada em meio sólido e inoculou-se em 20ml de meio YEB líquido, com pH ajustado para 7,5 e contendo os respectivos antibióticos. A bactéria foi cultivada por uma noite a 28°C em um agitador do tipo orbital com uma rotação de 120 a 150 rpm. Para a agrobactéria a fase exponencial de crescimento pode durar de 4 a 8 horas. O crescimento da cultura foi então monitorado pela leitura da absorbância (A) em um espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 560 a 660 nm. Pode-se considerar que a concentração da Agrobactéria, com uma absorbância $A_{600}=1,0$ equivale a 5×10^8 células/ml (LIN *et al.*, 1994).

A cepa EHA101 com o gene marcador de seleção *nptII*, também foi utilizada de forma independente, como um controle, nos experimentos de transformação. Ela foi cultivada em meio sólido YEB, geleificado com 15 g.L^{-1} de ágar, contendo os antibióticos Km 50 mg.L^{-1} , Sp 100 mg.L^{-1} , Sm 300 mg.L^{-1} , repicada a cada trinta dias e cultivada em meio líquido YEB 24 horas antes da inoculação no tecido vegetal, em um agitador do tipo orbital, com rotação de 120 a 150 rpm e temperatura de 28°C.

3.2.3 Teste de resistência ao antibiótico canamicina

Visando determinar a dose letal mínima do agente de seleção e o tempo de exposição dos explantes ao agente de seleção pela avaliação da resistência dos explantes ao antibiótico canamicina foi realizado um experimento com folhas jovens obtidas de sementes germinadas em casa de vegetação, com duas repetições. As folhas foram desinfestadas com etanol 70% por dois minutos e com hipoclorito de sódio 2,5% durante dez minutos e, em seguida, lavadas em água deionizada estéril por três vezes. De cada folha retirou-se as bordas, permanecendo apenas o limbo e a nervura central. O experimento foi realizado com três tratamentos: 1) meio MS suplementado com BAP $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, 2) MS + $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + 50 mg.L^{-1} Km; 3) MS + $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + 100 mg.L^{-1} Km.

Cada tratamento tinha dez repetições (placas) e cada parcela com dez explantes, totalizando cem explantes por tratamento. Avaliou-se após trinta dias, a porcentagem de sobrevivência dos explantes. O experimento foi mantido em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram transformados segundo o arco seno da raiz de $x/100$. Foi utilizada a análise de

variância com teste F e o teste de comparação múltipla de médias de Duncan.

3.2.4 Teste de co-cultura

Foi realizado um experimento com duas repetições, visando obter o melhor tempo de co-cultura entre o material vegetal e a bactéria contendo o gene *antisense*. Foram utilizadas folhas de plantas jovens, oriundas da germinação de sementes em casa de vegetação. Quatro tratamentos foram realizados, o primeiro (T0) é o controle positivo, onde as folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm², retirando-se as bordas. Após, os explantes foram postos em um erlenmeyer com 20 mL de meio líquido MS, sem a bactéria, por um período de vinte minutos. Decorrido este tempo, foram postos sobre papel filtro para retirar o excesso de líquido e então transferidos para o meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP onde permaneceram por uma semana no escuro. Este controle serviu para monitorar o sistema de regeneração de brotos sem o efeito da bactéria.

O segundo tratamento (T1) é o controle negativo, onde os explantes foram postos em um erlenmeyer contendo 20 mL de meio líquido MS, sem a bactéria, por vinte minutos. Foram postos sobre papel filtro e transferidos para o meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP + 100 mg.L⁻¹ Km, onde permaneceram por uma semana no escuro. Este controle serviu para monitorar a eficiência do agente de seleção.

No terceiro tratamento (T2) testou-se 24 horas de co-cultura dos explantes. Os explantes foram inoculados em 20 mL de meio líquido MS contendo 200 µL da solução da bactéria, onde permaneceram por vinte minutos. Após, os explantes foram lavados em meio líquido MS, postos em papel filtro para retirar o excesso de líquido e postos em placas de petri contendo 20 mL de meio MS sólido sem reguladores de crescimento, onde permaneceram 24 horas no escuro. Passado este período, os explantes foram transferidos para o meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP + 500 mg.L⁻¹ carbenicilina + 100 mg.L⁻¹ Km onde permaneceram por uma semana no escuro. O quarto tratamento (T3) foi idêntico ao terceiro (T2), diferindo apenas no tempo de co-cultura dos explantes, que foi de 48 horas. A densidade ótica da bactéria foi igual a 1,0.

Cada tratamento constou de dez repetições e cada parcela tinha dez explantes. Após uma semana no escuro, os explantes dos tratamentos T0 e T1 foram transferidos para os mesmos meios, porém na presença de luz. Os explantes dos tratamentos T2 e T3, após uma semana no escuro, foram transferidos para o mesmo meio, porém com a concentração do antibiótico carbenicilina reduzida à metade, e na presença de luz. Permaneceram em

sala de crescimento e após trinta dias foi avaliada a percentagem de sobrevivência dos explantes para os quatro tratamentos.

Para a análise estatística dos resultados foi utilizada a análise de variância com teste F e o teste de comparação múltipla de médias de Duncan.

3.2.5 Ensaio de transformação

O protocolo de transformação estabelecido por MANDERS *et al.* (1994) foi adaptado ao nosso material. Nestes ensaios foram utilizados materiais jovens e adultos de maracujá-amarelo. Material jovem: folhas retiradas de mudas regeneradas *in vitro* a partir de sementes e de três genótipos fornecidos pelo IAPAR: 309, 352 e 156x123. Material adulto: folhas retiradas de mudas mantidas em casa de vegetação, de cinco genótipos IAPAR: 309, 352, 156 x 123, 65-1 e 87-1 (Figura 3).



FIGURA 3- Segmentos nodais de maracujá-amarelo, regenerados a partir de explantes foliares em meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo, que serviram de explantes para a transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*.

A inoculação dos explantes com a bactéria foi feita da seguinte maneira:

1- As folhas foram cortadas mantendo-se a nervura central e retirando apenas as bordas. Foram isolados dez explantes por parcela; cada parcela equivale a uma placa de petri, 7 repetições por genótipo e 6 genótipos, sendo os 5 do IAPAR e o outro comercial (semente). Em cada experimento de inoculação foram utilizadas duas cepas de *Agrobacterium*, uma contendo o plasmídeo pGA643 AS (com o gene *antisense* da ACCO do melão) e a cepa EHA101 com o gene *nptII*. Para cada cepa foram inoculados setenta explantes de cada genótipo;

2- Os explantes foram postos em um erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 50mL de meio líquido MS e 500 µl da solução da agrobactéria, uma diluição portanto de cem vezes. A cada inoculação era feita uma leitura da densidade ótica da solução da bactéria à 600 nm. A média das leituras foi igual a 1,0 ou seja, 5×10^8 bactérias/mL. Os explantes permaneceram por duas horas nesta solução sob agitação em um agitador do tipo magnético (rotação mínima) à temperatura ambiente da sala de cultivo, em torno de 25 a 26°C;

3- Após, os explantes foram lavados em meio líquido MS, por 4 vezes, e postos em papel filtro estéril para retirar o excesso de líquido e então foram co-cultivados em meio MS, por 24 horas. Após a etapa de co-cultivo, os explantes foram transferidos para o meio MS suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, contendo o antibiótico carbenicilina 500 mg.L^{-1} e Km 100 mg.L^{-1} por uma semana no escuro;

4- Após uma semana, os explantes foram transferidos para o meio MS + $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + carbenicilina 250 mg.L^{-1} + canamicina 100 mg.L^{-1} onde permaneceram por mais duas semanas e na presença de luz. A cada duas semanas a concentração de carbenicilina foi reduzida à metade até que se obtivessem os primeiros brotos regenerantes e supostamente transformados;

5- Os brotos foram então transferidos para o meio de alongamento e enraizamento MS/2 suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA₃ e 100 mg.L^{-1} de Km.

Cada broto foi obtido de um explante regenerado em meio seletivo.

3.2.6 Análise das plantas por PCR

Ao todo, nove plantas regeneradas e enraizadas em meio seletivo, supostamente transformadas com o gene marcador *nptII*, e seis plantas supostamente transformadas com o gene *antisense* da ACCO do melão foram analisadas pela técnica de PCR.

As reações de *PCR* ocorreram em um termociclador programável. A visualização dos produtos da amplificação ocorreu em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, por eletroforese horizontal.

Foram consideradas *PCR* + as plantas que apresentaram amplificação de fragmentos de DNA no gel de agarose, sendo que o tamanho dos fragmentos amplificados correspondem a: *ACCO sense* (1200 pb), *ACCO antisense* (850 pb) e *nptII* (800pb).

3.2.6.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizado um procedimento adaptado do método original de DOYLE e DOYLE (1987). Coletou-se um disco de tecido foliar jovem com o auxílio de um eppendorf. Acrescentou-se a este eppendorf 400 µL do tampão de extração: 200mM de Tris-HCl (pH 7,5), 250mM NaCl, 25mM EDTA (pH 8,0), 0,5% de SDS, diluídos em água ultra pura estéril. Com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado, macerou-se bem o tecido vegetal. Incubou-se por trinta minutos em banho-maria à uma temperatura de 60°C. Adicionou-se 400 µL de uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Após, em um vortex, foi feita a homogeneização da suspensão. Centrifugou-se à temperatura ambiente (20-25°C) por dez minutos em centrífuga com uma velocidade de 12.000 g. Recuperou-se o sobrenadante (aproximadamente 300 µL) que foi transferido para um novo eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se então 600 µL de isopropanol gelado (-20°C) e foi feita uma homogeneização. Centrifugou-se novamente por dez minutos a 10.000 g. Eliminou-se o sobrenadante e recuperou-se o pellet (ácidos nucleicos). Lavou-se este pellet com 1 mL da solução de lavagem gelada (colocada por vinte min no freezer): etanol 76% e acetato de amônio 10 mM. Centrifugou-se por mais dez minutos a 10.000 g. Eliminou-se o sobrenadante e deixou-se o pellet para secar dentro do próprio eppendorf a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o pellet em 100 µL de água UHQ (miliQ estéril). Este DNA extraído ficou armazenado à 4°C, até sua utilização.

3.2.6.2 Reação de *PCR*

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas.

Para confirmar a presença da seqüência do clone pLEM e do fragmento *nptII*, no DNA das plantas regeneradas, foi utilizada a técnica de *PCR*, utilizando um termociclador programável Progene (Techne).

Como controle positivo da reação de *PCR* para as plantas contendo o gene *antisense*, foi utilizado o DNA plasmidial, extraído da linhagem de *A. tumefaciens* EHA 101, contendo o gene *MEL1* em orientação *antisense*. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa EHA 101 contendo o gene *nptII*. Outro controle positivo foi utilizado, neste caso, plantas transformadas de melão cv. *Cantaloup*, com o clone pAP4 em orientação *antisense*, isolado em maçã (SILVA, 2000) que possuem também o gene *nptII*. O marcador de peso molecular utilizado foi o λ DNA/*Hind III*.

Alguns trabalhos demonstraram que ocorre homologia entre os genes que codificam para a ACCO, dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes (ZIMMER, 1998). A partir destes trabalhos foi possível determinar, que a homologia entre a ACCO do melão e da maçã é de 85 a 95% (SILVA, 2000) o mesmo para o maracujá. Existem determinadas seqüências de oligonucleotídeos que amplificam em pontos homólogos nestas espécies. Por esta razão, os *primers* utilizados foram os que amplificam para a ACCO em sentido *sense* e *antisense*, que foram construídos para o plasmídeo pAp4 de 11,6 Kb, onde está inserido o clone de DNA correspondente à ACCO isolada em maçã, em orientação *antisense*, cedida pelo Dr. César Rombaldi, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas.

Para cada reação de *PCR* foi utilizado 3 μ L de tampão *Taq* DNA Polimerase 10X (Pharmacia®), 80 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Pharmacia®), 3,5 μ L de $MgCl_2$, 3,5 μ L de cada *primer* (GibcoBRL®), 6 μ L de DNA em um volume final de 30 μ L. A enzima *Taq* DNA Polimerase (1,25 unidades) (Pharmacia®) foi adicionada após o ciclo inicial de desnaturação. As condições de realização das reações *PCR* são apresentadas na Tabela 2.

Para a amplificação do segmento do clone antisense (pAP4as) foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (*primers*):

pAP4as- U – 5'- GGA TGA AAG TGA ATT AAA ATT- 3'

pAP4as- D- 5'- TAG CTA GCT TAG CTC ATC GCA- 3'

Para amplificação do fragmento do gene endógeno utilizou-se os seguintes primers, obtidos a partir da seqüência genômica (LASSERE *et al.*, 1996):

pAP4s- U- 5'- AAG GAT CCG CAC AAA CCA AAT CTT GTA C- 3'

pAp4s- D- 5'- AAG GAT CCT AAG CTG AAA GTG AAT TTA AAT TA- 3'

Para amplificação do fragmento do gene *nptII* utilizou-se os primers Raq-U e Raq-D (GibcoBRL®).

Os resultados das reações de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,7% (m/v) com brometo de etídeo, utilizando-se DNA do fago lambda digerido com *HindIII* (GibcoBRL®) como marcador de peso molecular. O tamanho dos fragmentos amplificados corresponde a: *sense* (1200 pb), *antisense* (850 pb) e *nptII* (800 pb).

TABELA 2 - Programação do termociclador Progene® utilizado para as reações de PCR.

Ciclo	Programa nº	Passo	Objetivo	Condição (temp./tempo)
1º	1	1	Desnaturação inicial	95°C/6:00min
1º	2	1	Anelamento	53°C/2:00min
		2	Extensão	72°C/2:00min
2º- 29º	3	1	Desnaturação	95°C/1:00min
		2	Anelamento	53°C/2:00min
		3	Extensão	72°C/2:00min
30º	4	1	Desnaturação	95°C/1:00min
		2	Anelamento	53°C/2:00min
		3	Complementar extensão	72°C/11:00min
31º	5	1	Refrigeração	4°C/n horas

3.3 COLORIMETRIA, PRODUÇÃO DE ETILENO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACCO EM FRUTOS DE MARACUJÁ

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas.

Frutos comerciais de maracujá-amarelo foram analisados em um colorímetro (MINOLTA CORPORATION ®) a fim de determinar, por meio da radiação ultravioleta,

valores absolutos da cor de cada um dos grupos, identificados pela numeração: 01, 02 e 03. Esta técnica facilita a classificação dos frutos em relação ao estágio de maturação. Três frutos de cada grupo foram analisados. Cada fruto foi marcado em oito partes iguais, com o auxílio de um pincel atômico, e a média destas leituras resultou em um valor absoluto de cor. A variável luminosidade (L) varia de zero (preto total) a 100 (branco total); é a opacidade da cor, ou seja, quanto é mais escuro ou mais claro. A outra variável é designada como "a", que varia de -200 (verde) até +200 (vermelho), "b" varia de -200 (azul) a +200 (amarelo).

Para a análise da produção de etileno, foram utilizados frutos de maracujá-amarelo dos três grupos: 01, 02 e 03. A produção de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, em cromatógrafo Varian 3300. Três frutos de cada grupo foram pesados e acondicionados em três baldes plásticos com capacidade para 5 L. Após 1h foi coletado 1mL da atmosfera gasosa, com auxílio de uma seringa hipodérmica, determinando-se a produção de etileno. Uma segunda leitura foi realizada após 2h. Os resultados foram expressos em nanolitros de etileno.hora⁻¹.grama⁻¹ de matéria fresca (nL.h⁻¹.g⁻¹).

A atividade enzimática da ACCO foi determinada através da produção de etileno obtida após 1h de incubação do suco dos frutos a 22°C-25°C. Foi utilizado um fruto de cada grupo para a análise. Duas soluções foram utilizadas, o mix 1, com 250µL da enzima ACC, 10µM de sulfato ferroso (FeSO₄), 30mM de ascorbato de sódio, 30 mM de bicarbonato de sódio, diluídos em tampão Tris-HCl 100 mM, para um volume final de 20 mL. O mix 2 contendo as mesmas soluções, porém sem adição da enzima ACC, constituindo o primeiro controle da reação. O segundo controle foi feito apenas com o extrato protéico dos frutos. Foram utilizados frascos com capacidade para 10 mL. Para cada grupo foram feitas três repetições com ACC e três sem ACC (controle 1), mais uma repetição para o segundo controle. Em cada frasco foi adicionado 1mL do mix e 1 mL do suco extraído da polpa dos frutos. Os frascos foram mantidos sob agitação por 15 min em um agitador do tipo orbital. Após este período foi feita uma aeração com um aparelho nebulizador. Os frascos foram novamente fechados e mantidos sob agitação por uma hora. Após, foi feita a coleta de 1 mL da atmosfera gasosa. O resultado foi expresso em nanolitros de etileno por grama de polpa (nL etileno/g polpa). Estas condições foram determinadas por DUPILLE *et al.* (1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO DE ORGANOGÊNESE A PARTIR DE MATERIAL JOVEM

A partir dos resultados apresentados na tabela 3, observou-se que para cinco das seis variáveis avaliadas, a posição do explante em relação ao meio de cultivo não exerceu influência significativa, quando foi utilizado material jovem como fonte de explante. Apenas a variável porcentagem de explantes com calos, expressou um aumento significativo quando os explantes foram cultivados na posição abaxial.

TABELA 3 – Efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material jovem de maracujá amarelo. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura.

Variáveis	Posição	
	Abaxial	Adaxial
Porcentagem de explantes com gemas	33,03 a	35,98 a
Nº médio de gemas por explante	0,92 a	0,96 a
Nº médio de folhas por explante	1,09 a	1,17 a
Comprimento médio de folhas (cm)	0,36 a	0,58 a
Comprimento da haste principal (cm)	0,34 a	0,46 a
Porcentagem de explantes com calos	41,65 a	20,66 b

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste F da análise de variância.

4.1.1 Porcentagem de explantes com gemas

A resposta organogenética ocorreu a partir do 10º dia de cultivo. Foi possível observar um aumento na espessura do tecido, uma leve curvatura nas extremidades dos explantes com o surgimento das primeiras gemas adventícias, aos vinte dias, na superfície do explante próximo à nervura central e nas bordas dos mesmos.

A ocorrência de organogênese direta, com aumento no tamanho e na massa verde do explante, também foi observada para o maracujá- amarelo, por DORNELAS e VIEIRA (1994).

A análise de variância conjunta para a porcentagem de explantes com gemas, apresentada no Anexo 1, mostrou que a análise de regressão polinomial para tratamentos

(concentrações de BAP) para ambas as posições abaxial e adaxial, foi significativa, mostrando um comportamento quadrático (Figura 4).

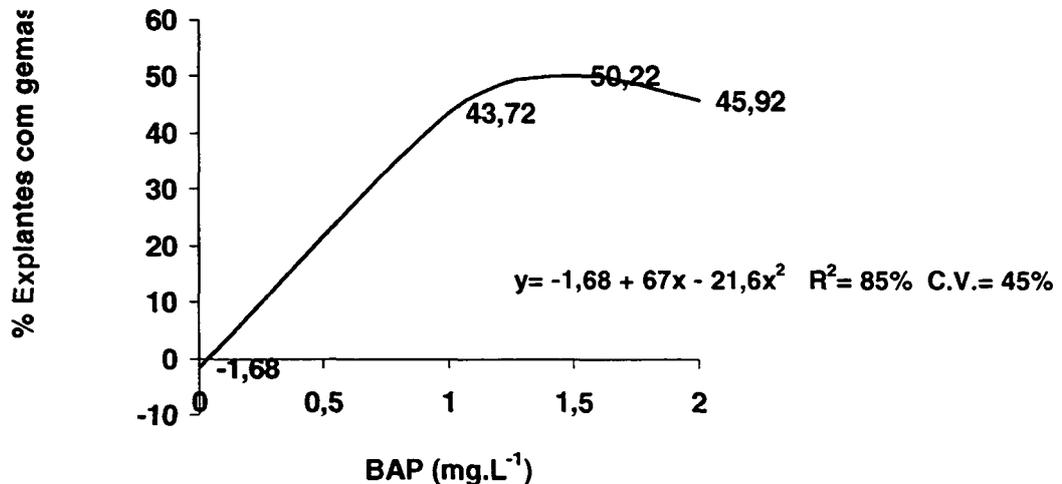


FIGURA 4. Efeito de três concentrações de BAP na porcentagem de formação de gemas, a partir de explantes foliares de material jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.

Na Figura 4 foi observado que, no meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ BAP, em média 43,72% dos explantes regeneraram gemas. Este resultado pode ser comparado com aquele obtido por RIBAS (2000), em seu trabalho com material jovem de maracujá-amarelo, onde 43,4% dos explantes foliares formaram gemas quando o meio MS foi suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP. Quando foi adicionado ao meio de cultura 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, em média 50,22% dos explantes regeneraram gemas. Por outro lado, na dose de 2 mg.L⁻¹ BAP este valor sofreu um decréscimo de 4,3%.

Outros trabalhos mostraram um aumento na formação de gemas a partir de segmentos internodais de maracujá-amarelo, observado quando se utilizou o meio MS suplementado com BAP até 2,1 mg.L⁻¹ (BIASI *et al.*, 2000). Quarenta por cento dos explantes formaram gemas na base do explante, quando foi adicionado ao meio de cultura 1 mg.L⁻¹ de BAP e 70% dos explantes com gemas quando a concentração deste regulador de crescimento foi aumentada para 2 mg.L⁻¹. Segundo os autores, doses superiores foram prejudiciais para a organogênese, apresentando um efeito fitotóxico. Resultado semelhante foi obtido por DORNELAS e VIEIRA (1994) que obtiveram 41,7% de regenerantes quando suplementaram ao meio MS 1 mg.L⁻¹ de BAP. KAWATA *et al.* (1995) estipularam também as

concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BAP como sendo as melhores para a regeneração de explantes foliares de *Passiflora edulis* Sims.

Na ausência do regulador de crescimento foi observada uma proliferação celular nas extremidades seccionadas, com formação de tecidos de cicatrização, nos tratamentos com 1 e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Resultado semelhante foi obtido por DORNELAS e VIEIRA (1994).

4.1.2 Número médio de gemas por explante foliar

Conforme os dados apresentados na Tabela 3, observou-se que os resultados do experimento de organogênese, que avaliou as posições abaxial e adaxial dos explantes em cultivo, não diferiram estatisticamente para esta variável. Apesar disto, a diferença entre os Quadrados médios (QM) dos resíduos, encontrada para ambas as posições, foi superior a 4. Segundo GOMES (1970), a análise de variância conjunta dos dados só pode ser aplicada, quando a diferença entre os QM dos resíduos não for superior ao valor 4. Por esta razão, a análise estatística do experimento que avaliou as posições do explante no meio de cultura foi realizada individualmente. A análise de variância conjunta para as posições abaxial e adaxial está apresentada no Anexo 2.

A análise de variância para as concentrações de BAP em relação ao número médio de gemas formadas por explante, para a posição abaxial de cultivo, foi significativa (Anexo 3). Com este resultado, foi efetuada a análise de regressão polinomial, que permitiu a visualização dos comportamento das diferentes concentrações de BAP para esta variável, com um coeficiente de determinação $r^2 = 57\%$ (Figura 5). A análise de variância para tratamentos, na posição adaxial de cultivo, foi significativa (Anexo 4). Foi encontrada uma regressão quadrática significativa para o número de gemas por explante, em função da concentração de BAP aplicada ao meio MS, com um coeficiente de determinação $R^2 = 72\%$ (Figura 6).

Analisando a Figura 5, foi possível constatar após trinta dias, que, na ausência de BAP, houve um início de resposta morfogênica, com a formação de 0,7 gemas por explante. Não houve diferença estatística significativa entre o número de gemas formadas por explante para esta e as demais concentrações de BAP, sendo observado que na adição de 2,0 mg.L⁻¹ ao meio de cultura MS, houve em média 1 gema formada por explante jovem cultivado nas posições abaxial (Figura 5) e adaxial (Figura 6). Contrariamente a estes resultados, RIBAS (2000) obteve em seus experimentos com maracujá - amarelo, médias de 5,4 e 4,6 gemas por explante quando adicionou ao meio MS 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP

respectivamente.

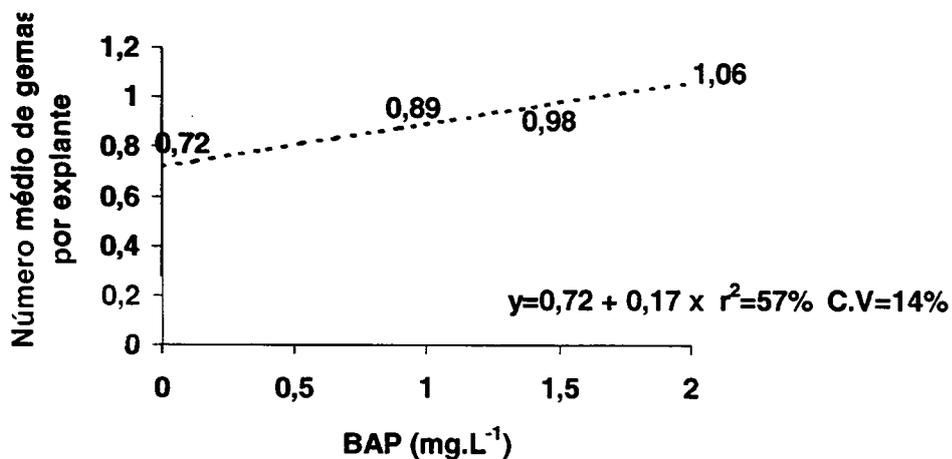


FIGURA 5. Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio de gemas regeneradas por explante foliar jovem de maracujá - amarelo, médias para a posição abaxial do explante no meio de cultura.

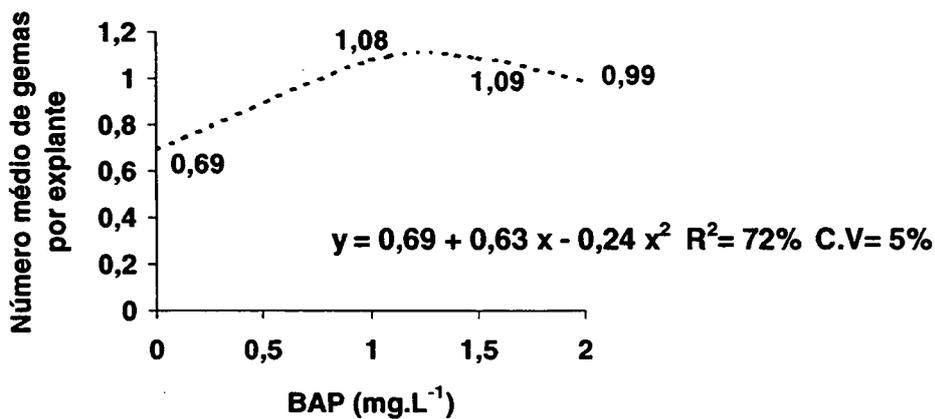


FIGURA 6 - Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio de gemas regeneradas por explante foliar jovem de maracujá - amarelo, médias para a posição adaxial do explante no meio de cultura.

Uma possível explicação para esta discordância nos resultados, seria a utilização de folhas cotiledonares no trabalho de RIBAS (2000) e de folhas jovens no presente caso. Segundo MARGARA (1988), o primeiro par de folhas de uma planta é capaz de regenerar com maior eficiência do que as folhas mais tardias e com isso, a possibilidade de que mais de uma gema seja formada também é maior.

Alguns trabalhos relatam maior porcentagem de regeneração de gemas adventícias, quando o tecido que servirá de explante sofre algum tipo de ferimento ou escarificação. Células de folhas de maçã, feridas próximas ao pecíolo, regeneraram maior número de gemas adventícias por explante. Folhas escarificadas da mesma espécie apresentaram também maior porcentagem de regenerantes em relação ao tecido íntegro, aumentando o número de gemas formadas por explante. Este fato foi associado à posição do explante, resultados positivos sendo relatados para aqueles explantes cultivados na posição adaxial (De BONDT, 1995; SCHUCH, 2000).

4.1.3 Número médio de folhas por explante

A análise de variância conjunta do experimento foi empregada para esta variável, não ocorrendo diferença estatística significativa entre as posições abaxial e adaxial de cultivo (Tabela 3).

Houve diferença estatística significativa entre as concentrações de BAP, o que possibilitou a análise de regressão polinomial para esta característica. A análise de regressão mostrou um comportamento quadrático para o número de folhas por explante em relação à concentração de BAP utilizada (Anexo 5, Figura 7). O valor máximo obtido de 1,33 folhas por explante, ao final de trinta dias, ocorreu quando o meio de cultura continha 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Após, houve um decréscimo, correspondendo à concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1,26 folhas em média (Figura 7). Muitas das brotações não conseguiram se desenvolver, e outras tornaram-se necróticas em poucos dias. Este quadro foi alterado quando estas brotações foram transferidas para o meio de alongamento. Fato semelhante foi observado por BIASI *et al.* (2000), que apesar de sucessivas repicagens, observaram que muitas brotações não conseguiram se desenvolver.

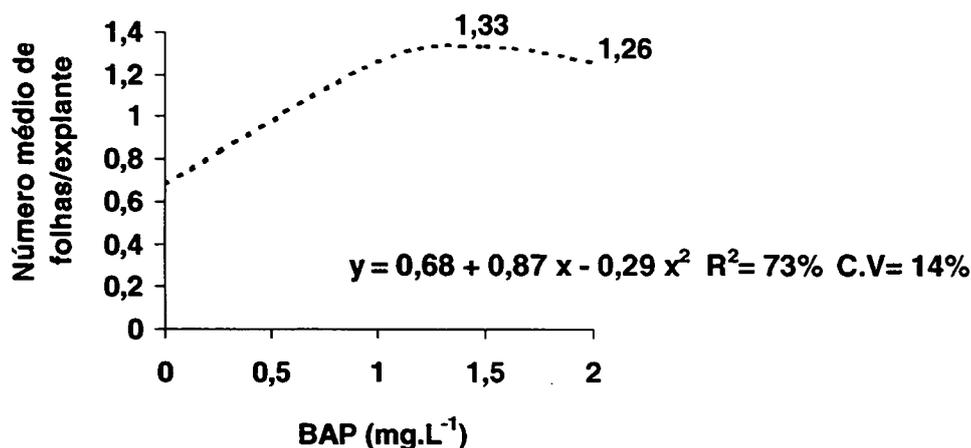


FIGURA 7 - Efeito de três concentrações de BAP sobre o número médio das folhas dos brotos regenerados a partir de explante jovem de maracujá – amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.

4.1.4 Comprimento médio das folhas

Pelo teste F da análise de variância, foi possível observar que não houve diferença estatística entre as posições (Tabela 3). No entanto, seguindo a regra estatística proposta por GOMES (1970), o experimento que avaliou a posição do explante no meio de cultura foi avaliado individualmente. A análise de variância conjunta para as posições abaxial e adaxial está apresentada no Anexo 6.

Pela análise de variância do comprimento médio de folhas, posição abaxial de cultivo, apresentada no Anexo 7, constatou-se a significância estatística dos tratamentos e pela análise de regressão polinomial, verificou-se o comportamento quadrático para a interação entre as diferentes concentrações de BAP e o comprimento médio das folhas por explante (Figura 8). Não houve significância estatística das diferenças entre os tratamentos, quando os explantes foram cultivados na posição adaxial (Anexo 8), por esta razão a equação de regressão não foi apresentada na Figura 8.

O maior comprimento das folhas foi observado no meio de cultura contendo 1,5 mg.L⁻¹ de BAP (0,49 cm). No entanto, observou-se pela curva de regressão (Figura 8) que o maior valor para o comprimento das folhas ocorreu em uma concentração correspondente à 1,3 mg.L⁻¹ de BAP. Esta concentração não foi avaliada no entanto, como um tratamento no

experimento. Foi observado um decréscimo no comprimento das folhas quando o meio de cultura MS foi suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP (0,36 cm). Um coeficiente de variação de 68% foi encontrado para esta variável (Anexo 7). Sabe-se que as citocininas estimulam a produção de partes aéreas mas, quando em excesso, são capazes de promover a redução no comprimento das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento dos caules, impedindo conseqüentemente o alongamento das brotações (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

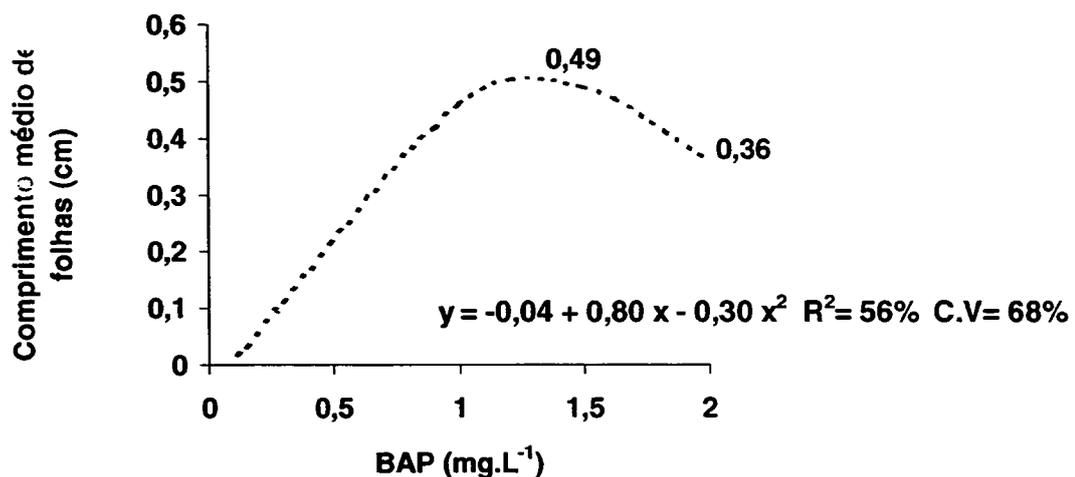


FIGURA 8 – Efeito de três concentrações de BAP sobre o comprimento médio das folhas dos brotos regenerados a partir de explante jovem de maracujá – amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.

4.1.5 Comprimento médio da haste principal

Pela observação dos quadrados médios dos resíduos, optou-se pela análise de variância conjunta dos experimentos, nas posições abaxial e adaxial do explante. Não houve diferença estatística entre os experimentos (Tabela 3).

Pela significância estatística dos tratamentos, obtida pela análise de variância do comprimento médio da haste principal, apresentada no Anexo 9, realizou-se a análise de regressão polinomial, obtendo-se um comportamento quadrático entre as diferentes concentrações de BAP e o comprimento médio da haste principal.

Conforme a Figura 9, o tratamento que apresentou melhor efeito sobre o crescimento da haste principal foi o meio MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP (0,58 cm de

comprimento). Também para esta característica, assim como para o comprimento médio das folhas, foi observado pela curva de regressão (Figura 9) um valor máximo para uma concentração de 1,3 mg.L⁻¹ de BAP, que não foi avaliada como um tratamento no presente trabalho. Foi constatado também, que não houve praticamente diferença para o incremento da haste nas concentrações de 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, sendo obtido 0,57 e 0,58 cm de comprimento, respectivamente.

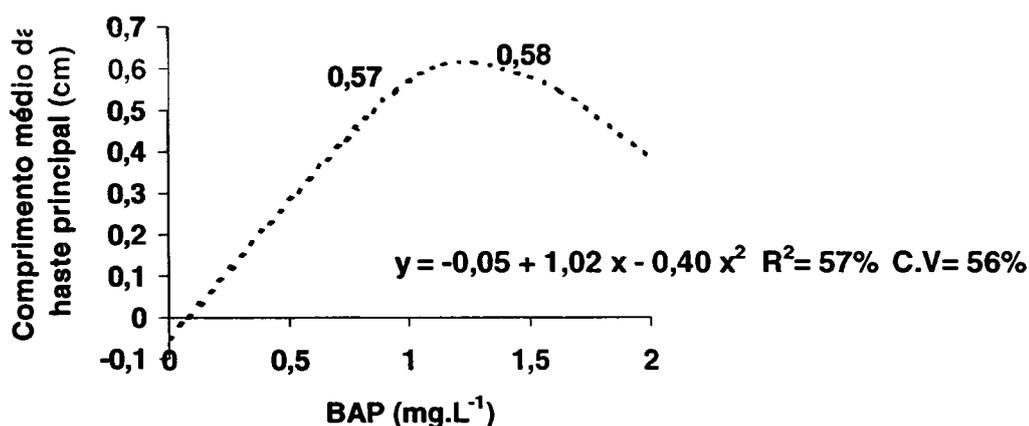


FIGURA 9 – Efeito de três concentrações de BAP sobre o comprimento médio da haste principal dos brotos regenerados a partir de material jovem de maracujá-amarelo, médias para as posições abaxial e adaxial do explante no meio de cultura.

Comparando esses resultados aos obtidos pela avaliação do número e comprimento médio de folhas, podemos supor que o crescimento da haste também foi menor em razão do balanço entre auxinas endógenas e citocininas (BAP), bem como a concentração de sais minerais que constituem o meio básico MS, ou mesmo o acúmulo de etileno produzido pelos tecidos, prejudicando a regeneração das brotações (BIASI *et al.*, 2000; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Quando o balanço citocininas/auxinas é positivo, observa-se a proliferação de gemas adventícias, pela quebra da dominância apical, além de um encurtamento dos entrenós e maior espessamento dos tecidos, não permitindo o alongamento das brotações. Por esta razão, o comprimento das hastes foi prejudicado, principalmente quando houve adição de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP ao meio MS (Figura 9).

4.1.6 Porcentagem de explantes com calos

Diferença estatística significativa foi encontrada para esta variável em relação à posição em que o explante foi cultivado (Tabela 3). Uma análise de variância individual foi realizada, mostrando a significância dos tratamentos e um comportamento quadrático para as curvas de regressão, entre as diferentes concentrações de BAP utilizadas e a formação de calos, para as posições abaxial e adaxial (Anexos 10 e 11). A análise de variância conjunta para as posições abaxial e adaxial está apresentada no Anexo 12.

A formação de calos iniciou em meio MS, a partir de 1 mg.L^{-1} BAP, e seu valor máximo após trinta dias, foi evidenciado no tratamento com 2 mg.L^{-1} BAP, com 85,52% e 59,65 %, para as posições abaxial e adaxial, respectivamente (Figuras 10 e 11).

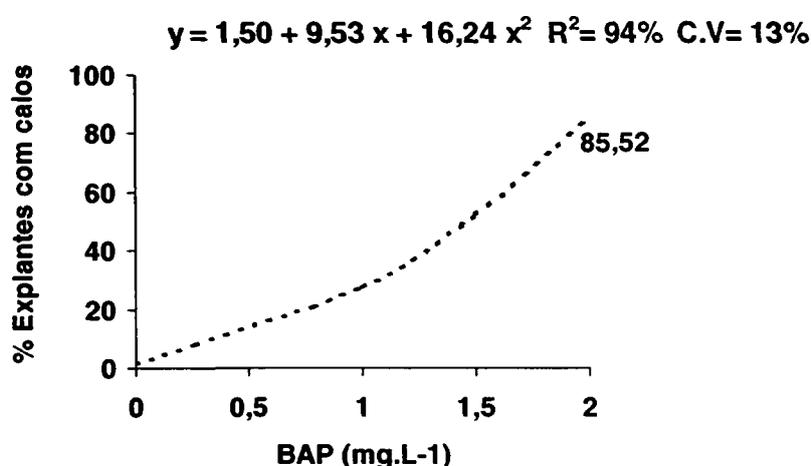


FIGURA 10 – Efeito de três concentrações de BAP sobre a porcentagem de explantes jovens de maracujá-amarelo que formaram calos, médias para a posição abaxial do explante no meio de cultura.

Em outros trabalhos com esta espécie, FARIA e SEGURA (1997) obtiveram calos em plântulas micropropagadas, quando utilizaram o meio MS suplementado com $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. BIASI *et al.* (2000), trabalhando com segmentos nodais, obtiveram de forma semelhante o início da resposta morfogênica após 7 dias de cultivo, com a formação de calos nas extremidades dos explantes, e um comportamento quadrático da curva de

regressão com valor máximo para 1,3 mg.L⁻¹ BAP, decrescendo a partir deste ponto. Observaram ainda que, mesmo na ausência do fitohormônio, 96,2% dos explantes formaram calos, confirmando outros estudos que relatam a importância do balanço endógeno de hormônios já existentes nos explantes antes de serem cultivados. Já no presente trabalho, não foi observado a formação de calos nos explantes cultivados apenas em meio de cultura MS.

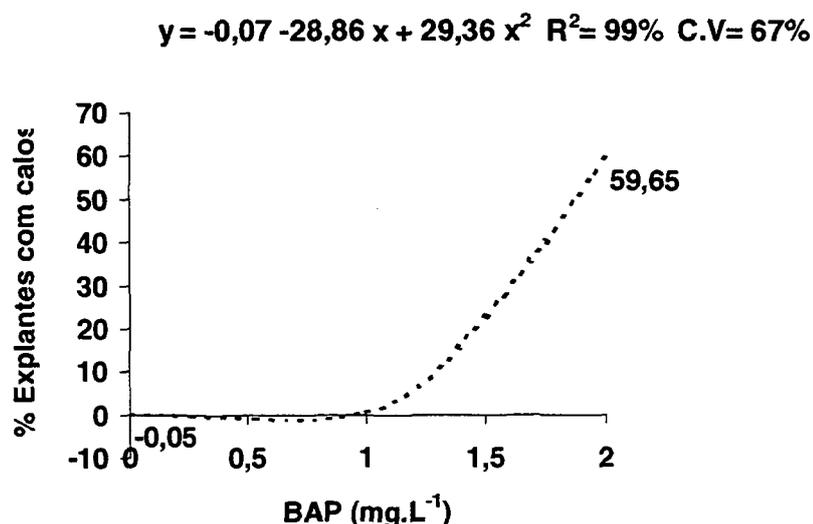


FIGURA 11 – Efeito de três concentrações de BAP sobre a porcentagem de explantes jovens de maracujá-amarelo que formaram calos, médias para a posição adaxial do explante no meio de cultura.

4.2 EXPERIMENTO DE ORGANOGÊNESE A PARTIR DE MATERIAL ADULTO

Houve interação significativa tríplice entre a maioria dos fatores estudados. Por esta razão, as análises foram individualizadas para cada genótipo, com exceção apenas para a porcentagem de explantes com calos, cujo teste F não foi significativo. O genótipo 309 apresentou melhores resultados quando seus explantes foram cultivados na posição adaxial, exceção apenas para a porcentagem de explantes com calos, onde não houve diferença estatística significativa (Tabela 4). O mesmo pode ser dito para o comportamento do genótipo 156 x 123, onde resultados superiores foram encontrados para o comprimento da haste principal e porcentagem de explantes com calos, quando os explantes foram

cultivados na posição adaxial (Tabela 6). No entanto, o genótipo 352 apresentou comportamento semelhante em ambas as posições, não sendo observada diferença estatística significativa entre as variáveis (Tabela 5).

TABELA 4 - Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipo IAPAR: 309. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio.

Variáveis	Posições	
	Abaxial	Adaxial
Porcentagem de explantes com gemas	22,3 b	36,2 a
Nº médio de gemas por explante	0,27 b	0,36 a
Nº médio de folhas por explante	0,77 b	0,96 a
Comprimento médio de folhas (cm)	0,21 b	0,35 a
Comprimento da haste principal (cm)	0,33 b	0,61 a
Porcentagem de explantes com calos	13,78 a	13,80 a

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

TABELA 5- Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipo IAPAR: 352. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio.

Variáveis	Posições	
	Abaxial	Adaxial
Porcentagem de explantes com gemas	22,70 a	23,90 a
Nº médio de gemas por explante	0,27 a	0,28 a
Nº médio de folhas por explante	0,78 a	0,73 a
Comprimento médio de folhas (cm)	0,29 a	0,33 a
Comprimento da haste principal (cm)	0,40 a	0,46 a
Porcentagem de explantes com calos	10,31 a	8,71 a

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

TABELA 6 –Médias do efeito da posição do explante nos quatro tratamentos de indução de gemas, sobre a organogênese a partir de folhas de material adulto de maracujá-amarelo, genótipos IAPAR: 156 x 123. Superfícies abaxial e adaxial em contato com o meio.

Variáveis	Posições	
	Abaxial	Adaxial
Porcentagem de explantes com gemas	24,4 a	27,2 a
Nº médio de gemas por explante	0,28 a	0,30 a
Nº médio de folhas por explante	0,70 a	0,73 a
Comprimento médio de folhas (cm)	0,23 a	0,27 a
Comprimento da haste principal (cm)	0,36 b	0,53 a
Porcentagem de explantes com calos	15,80 b	25,08 a

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

4.2.1 Porcentagem de explantes com gemas

Diferença estatística entre os resultados foi encontrada para esta variável, em relação à posição em que o explante foi cultivado. Maior porcentagem de explantes com gemas foi obtida quando explantes originários de plantas adultas, genótipo 309, foram cultivados com o lado adaxial em contato com o meio de cultura (Tabela 4, página 44). A posição adaxial de cultivo promoveu índices elevados de organogênese também para explantes foliares de macieira, no entanto, estes explantes eram provenientes de material juvenil (SCHUCH, 2000).

A interação entre posições, concentrações de BAP e genótipos foi significativa pelo teste F. Por esta razão, a análise de regressão polinomial foi empregada, visando avaliar o comportamento dos genótipos em cada tratamento e posição (Anexo 13). Um comportamento quadrático da curva de regressão foi observado para os genótipos, de acordo com as concentrações de BAP utilizadas em cada tratamento. As porcentagens de explantes com gemas não diferiram estatisticamente para os genótipos 309, 352 e 156 x 123 quando cultivados em meio MS, na ausência da citocinina, não havendo formação de gemas após trinta dias de cultivo e os explantes tornaram-se necróticos, mostrando a ineficiência deste tratamento na regeneração de gemas adventícias. A resposta morfogênica foi observada quando os genótipos foram cultivados em meio MS adicionado de 1 mg.L⁻¹ de BAP, sem apresentarem, no entanto, diferença estatística significativa entre eles. O melhor resultado foi obtido pelo genótipo 309, na posição adaxial de cultivo e em meio MS com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP (55,27%), diferindo estatisticamente dos demais. Para a concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP houve um decréscimo na formação de gemas (Figura 12).

Este decréscimo na formação de gemas foi observado também por BIASI *et al.* (2000) e DORNELAS e VIEIRA (1994), quando utilizaram concentrações elevadas de citocininas. Por outro lado, quando os explantes foram cultivados em posição abaxial, outro comportamento foi observado para os mesmos genótipos, sendo que a melhor concentração de BAP permaneceu a de 1,5 mg.L⁻¹ (Figura 13). O genótipo 156 x 123 apresentou maior porcentagem de explantes formando gemas (43,77%), no entanto, não houve diferença estatística significativa entre os três genótipos para esta posição de cultivo dos explantes (Figuras 13, 14 e 15, Anexo 14).

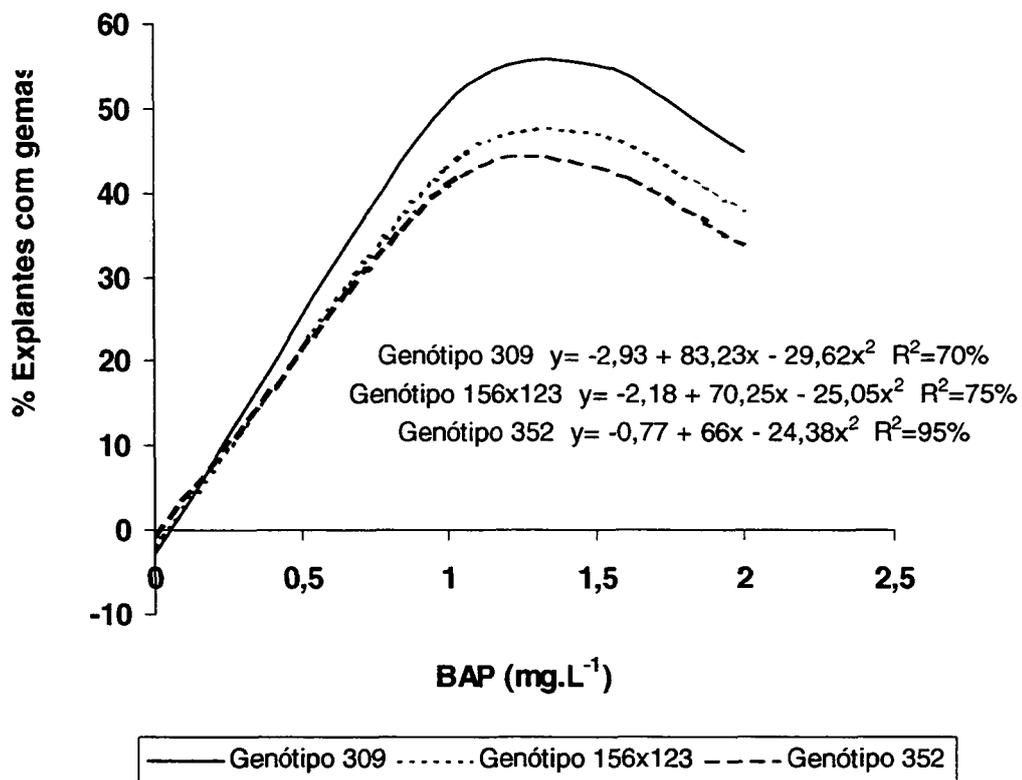


FIGURA 12 – Porcentagem de explantes que regeneraram gemas para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá – amarelo: 309, 352 e 156 x 123, na posição adaxial de cultivo.

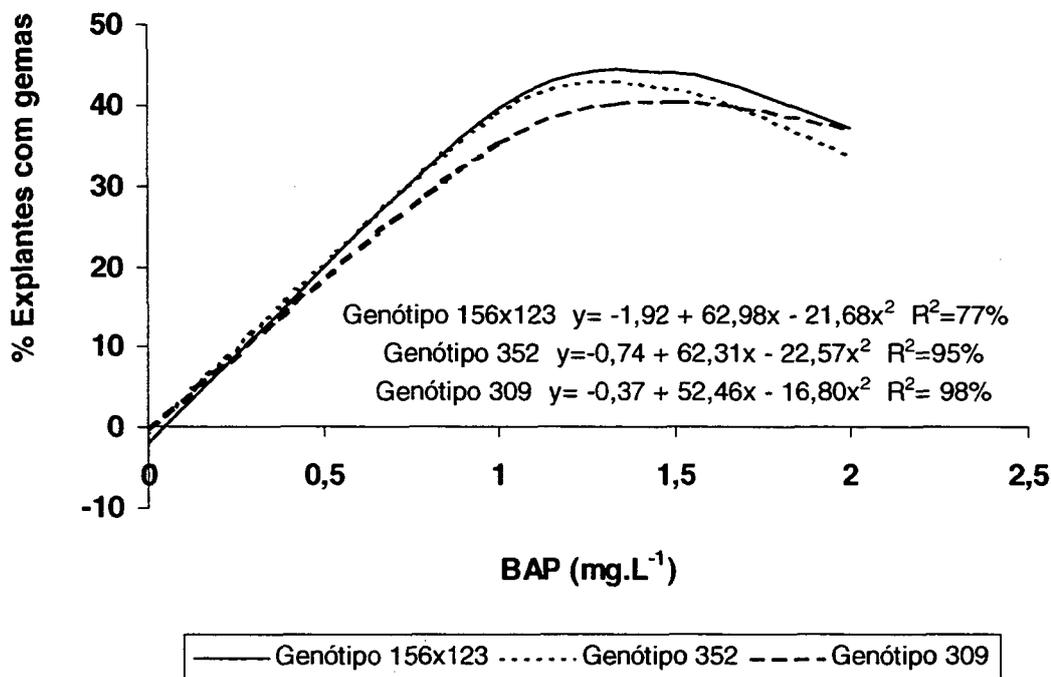


FIGURA 13 – Porcentagem de explantes que regeneraram gemas para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá – amarelo: 309, 352 e 156 x 123, na posição abaxial de cultivo.

Os resultados obtidos podem ser comparados aos descritos por RIBAS (2000), que obteve organogênese para estes genótipos, a partir de 21 dias de cultivo, sendo que a melhor resposta foi obtida para o genótipo 156 x 123 (64%), seguido por 352 (30%) e 309 (0%) em meio MS suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP. A dificuldade em se comparar este trabalho a outros, deve-se ao escasso relato na literatura sobre regeneração de espécies de *Passiflora* utilizando-se material adulto. Um destes relatos foi feito por DREW (1991), que utilizou segmentos nodais de várias espécies de *Passiflora*, nos estádios fisiológicos juvenil e adulto, onde apenas três explantes de material adulto, cresceram em termos de alongamento e expansão foliar dos brotos, em meio MS com 2iP, sulfato de adenina e AIA, todos na concentração de 3 mg.L⁻¹.



FIGURA 14 - Broto regenerado do genótipo 352 de maracujá-amarelo, em meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo.



FIGURA 15 – Broto regenerado de maracujá-amarelo, genótipo 156 x 123 em meio MS + 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, após trinta dias de cultivo.

4.2.2 Número médio de gemas por explante foliar

Conforme GOMES (1970), realizou-se uma análise de variância conjunta, onde uma interação estatística significativa foi encontrada para o comportamento dos genótipos em relação às diferentes concentrações de BAP e posições de cultivo dos explantes (Anexo 15).

Maior número de gemas foi encontrado para o genótipo 309, quando seus explantes foram cultivados na posição adaxial (Tabela 4, página 44). Para os demais genótipos não foi observada diferença estatística significativa em relação à posição de cultivo dos explantes (Tabelas 5 e 6, páginas 44 e 45).

Um comportamento quadrático das curvas de regressão foi observado para os genótipos, em relação às concentrações crescentes de BAP adicionadas ao meio básico MS. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as respostas dos genótipos cultivados em meio de cultura MS sem BAP ou suplementado com 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP. Maior número médio de gemas foi obtido a partir dos explantes foliares dos genótipos 309 e 156 x 123, cultivados na posição adaxial, em meio de cultura MS com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, 1,20 e 1,14 gemas respectivamente. Não houve diferença estatística entre os resultados destes genótipos. No entanto, o valor máximo para esta característica foi observado em uma concentração de 1,3 mg.L⁻¹ de BAP, pela curva de regressão. Esta concentração porém, não foi avaliada como um tratamento no presente trabalho (Figura 16, Tabela 7).

TABELA 7 – Médias do número de gemas por explante, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.

Genótipos	BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		1.0		1.5		2.0	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
156 x 123	0,70 a	0,70 a	0,85 a	0,86 a	1,10 a	1,14 a	0,88 a	0,88 a
309	0,70 a	0,70 a	0,89 a	0,89 a	0,98 b	1,20 a	0,92 a	0,92 a
352	0,70 a	0,70 a	0,90 a	0,92 a	1,02 b	1,03 b	0,88 a	0,88 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

A dificuldade encontrada em regenerar, em média, mais de uma gema por explante, resulta das características morfofisiológicas dos explantes. Folhas de plantas jovens apresentam maior atividade organogênica, em razão do maior número de células responsivas, que caracterizam-se por apresentar um grande número de receptores para aqueles reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, quando comparadas a um tecido adulto (GUERRA *et al.*, 1998; SALISBURY e ROSS, 1991). O estágio fisiológico

da planta, associado ao espaço físico em que ela se desenvolveu, bem como as características de temperatura e umidade do ambiente, promoveram muitas vezes o aparecimento de fungos e ácaros, que foram controlados através de pulverizações. Podemos supor que estas condições adversas prejudicaram o desenvolvimento das plantas em casa de vegetação e conseqüentemente, dos explantes foliares.

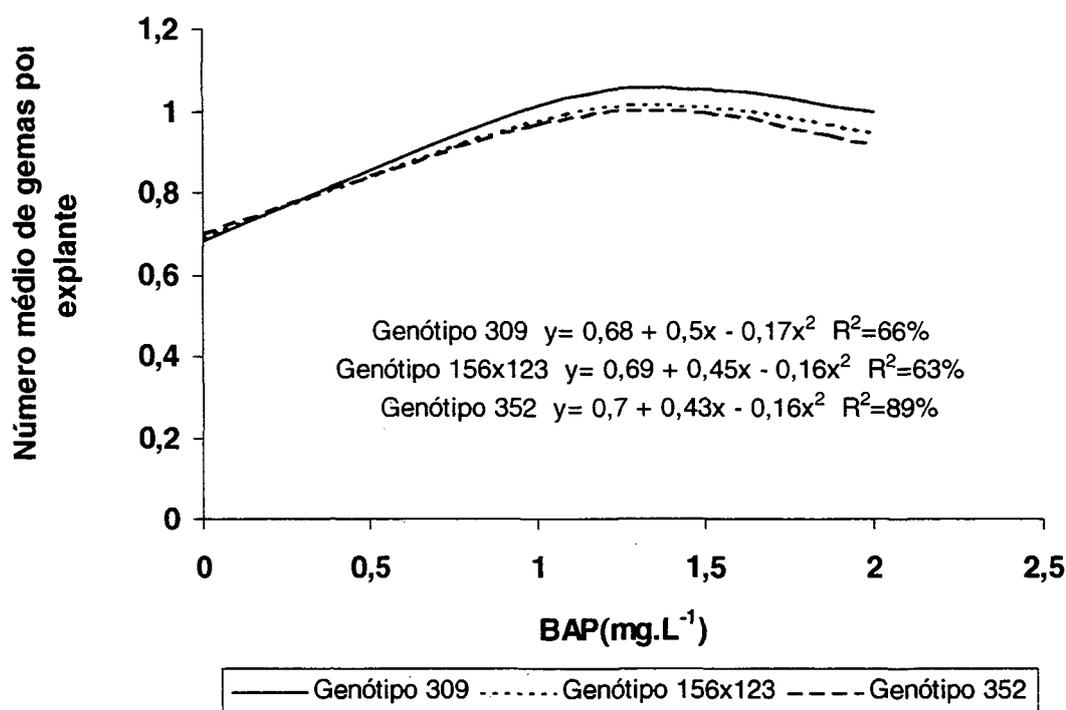


FIGURA 16 – Número médio de gemas regeneradas a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.

4.2.3 Número médio de folhas por explante foliar

A análise de variância conjunta não mostrou significância estatística para as posições abaxial e adaxial. No entanto, o comportamento dos genótipos em relação às diferentes concentrações de BAP utilizadas no experimento, apresentou interação tríplice significativa (Anexo 16). Esta variável apresentou um comportamento quadrático para a interação entre genótipos e concentrações de BAP. As respostas dos genótipos não diferiram estatisticamente quando cultivados em meio MS sem citocinina. Na concentração

de 1 mg.L⁻¹ de BAP observou-se um crescimento no número médio de folhas por explante para todos os genótipos, não havendo diferença estatística entre eles. O maior número de folhas foi observado na concentração de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, para os genótipos 309 (1,4) e 156 x 123 (1,38) não diferindo estatisticamente. Um número menor de folhas foi observado na concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP, não havendo diferença estatística entre os genótipos (Figura 17).

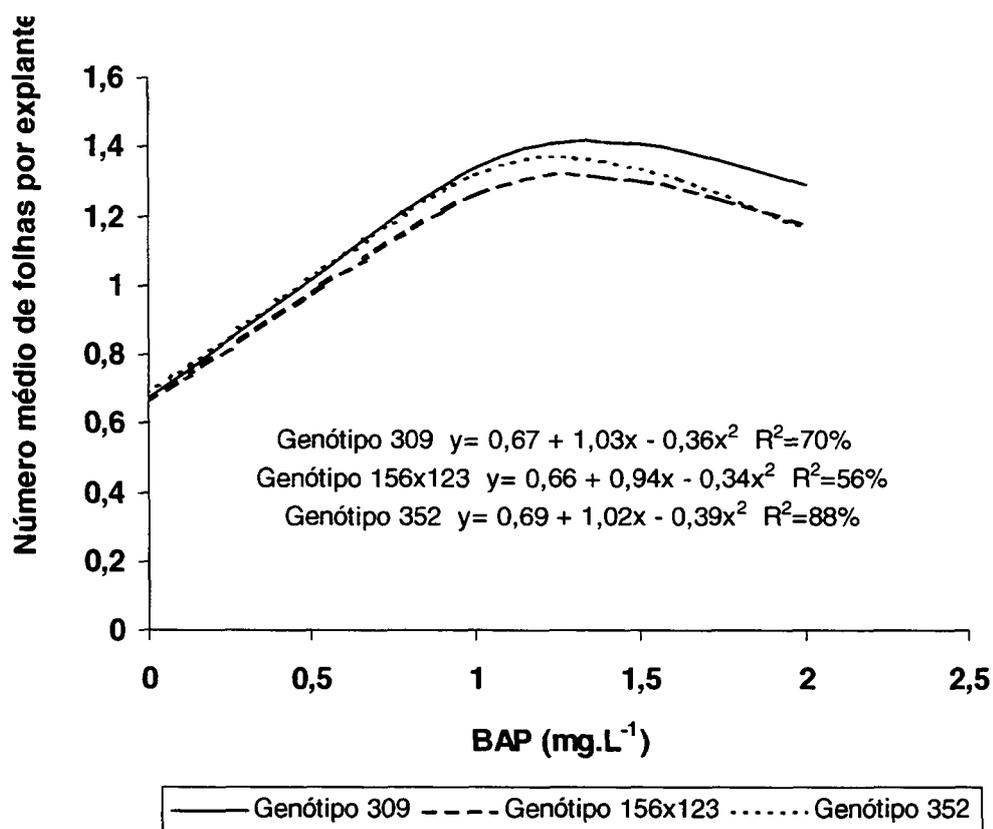


FIGURA 17 – Número médio de folhas em brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, nas posições abaxial e adaxial de cultivo.

4.2.4 Comprimento médio das folhas

Pela análise de variância conjunta foi constatada a interação tríplice significativa, visualizada pelo comportamento dos genótipos em relação às diferentes concentrações de

BAP aplicadas em cada posição de cultivo dos explantes (Anexo 18).

O genótipo 309 apresentou a melhor resposta para esta variável, quando os explantes foram cultivados na posição adaxial e no meio de cultura MS suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, no entanto, não houve diferença estatística entre este e os demais genótipos (Figura 18). Por outro lado, este genótipo apresentou um tamanho de folhas menor quando foi avaliada a posição abaxial de cultivo do explante (Tabela 8). Este resultado pode significar a existência de um maior número de células responsivas ao BAP na face adaxial da folha, confirmando relatos anteriores em macieira (De BONDY, 1995).

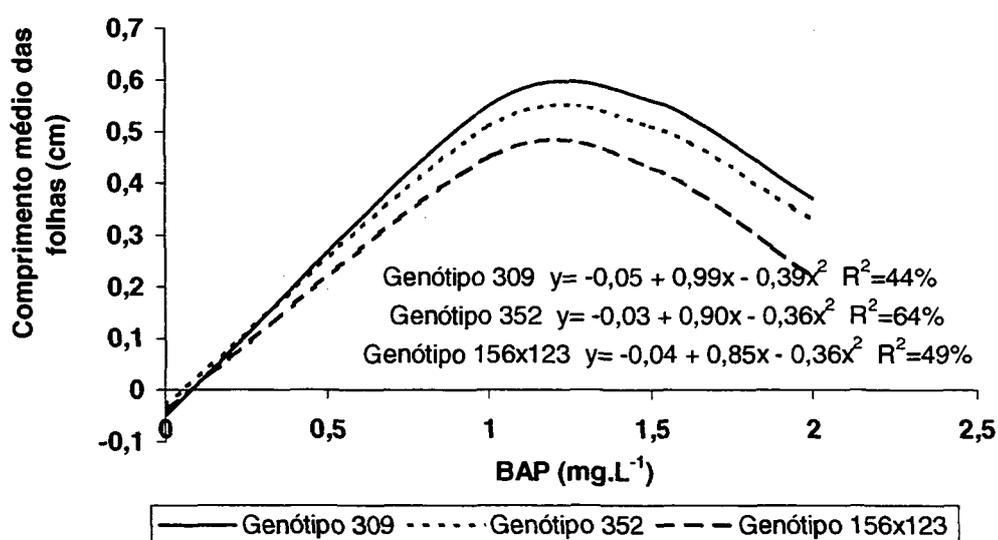


FIGURA 18 – Comprimento médio das folhas em brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.

Quando os mesmos genótipos foram cultivados com a face abaxial em contato com o meio de cultura, outras respostas foram obtidas. Não houve crescimento de folhas quando os explantes foram cultivados em meio básico MS na ausência de BAP. Isso foi observado para os três genótipos e para as posições abaxial e adaxial de cultivo. Na concentração de 1 mg.L^{-1} de BAP houve maior crescimento de folhas para os genótipos 352 (0,35 cm) e 309 (0,25 cm) (Tabela 8). Os genótipos 156 x 123 (0,67 cm) e 352 (0,60 cm) apresentaram um

tamanho de folhas maior quando cultivados com a face abaxial no meio de cultura MS com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP (Tabela 8). Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os genótipos, quando os explantes foram cultivados em meio MS com 2 mg.L⁻¹ de BAP e em ambas as posições de cultivo (Figura 18, Tabela 8).

TABELA 8 – Médias do comprimento de folhas por explante, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.

Genótipos	BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		1.0		1.5		2.0	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
352	0,00 a	0,00 a	0,35 a	0,33 a	0,60 a	0,78 b	0,20 a	0,25 a
309	0,00 a	0,00 a	0,25 ab	0,23 a	0,37 b	0,97 a	0,22 a	0,20 a
156 x 123	0,00 a	0,00 a	0,12 b	0,23 a	0,67 a	0,75 b	0,13 a	0,12 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

4.2.5 Comprimento médio da haste principal

A média geral para ambas as posições foi de aproximadamente 0,45 cm de comprimento, com um coeficiente de variação de 42%. Interação significativa foi encontrada entre as posições, genótipos e concentrações de BAP utilizadas, através da análise de variância e por esta razão uma análise de regressão polinomial foi empregada para determinar o comportamento destas variáveis (Anexo 18).

O início da caulogênese ocorreu quando os explantes foram cultivados em meio de cultura acrescido de BAP, sendo que os genótipos 352 e 309 apresentaram maior comprimento médio da haste para ambas as posições de cultivo dos explantes (Tabela 9). O melhor resultado para esta variável, foi obtido pelos explantes dos genótipos 309 e 156 x 123, cultivados na posição adaxial e em meio MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ BAP (Figura 19). Para a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, houve um crescimento menor dos caules, sem diferença estatística significativa entre genótipos e posições abaxial e adaxial dos explantes no meio (Tabela 9).

TABELA 9 – Médias do comprimento da haste principal, para três concentrações de BAP e três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, para as posições abaxial e adaxial de cultivo.

Genótipos	BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		1.0		1.5		2.0	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
352	0,00 a	0,00 a	0,52 a	0,52 a	0,78 ab	1,05 b	0,30 a	0,30 a
309	0,00 a	0,00 a	0,33 ab	0,38 ab	0,60 b	1,70 a	0,40 a	0,40 a
156 x 123	0,00 a	0,00 a	0,23 b	0,20 b	0,97 a	1,65 a	0,25 a	0,27 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

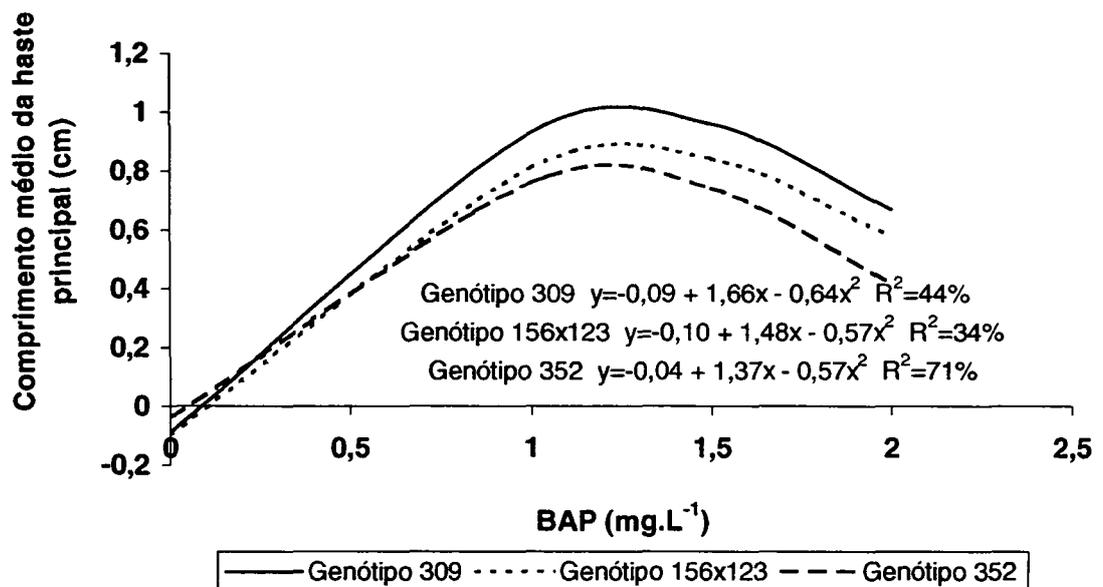


FIGURA 19 – Comprimento médio da haste principal de brotos regenerados a partir de explantes foliares de três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123 em resposta a três concentrações de BAP, na posição adaxial de cultivo.

4.2.6 Porcentagem de explantes com calos

Uma análise de variância conjunta foi realizada para esta variável (Anexo 19), não sendo observada diferença estatística entre os resultados da calogênese em função das posições de cultivo dos explantes. O teste de Duncan foi aplicado, o qual mostrou existir

diferença nos níveis de resposta dos genótipos em relação às diferentes concentrações de BAP utilizadas. A resposta morfogênica foi observada a partir de 10 dias de cultivo, com o espessamento dos tecidos e a formação de massas celulares nas zonas de cicatrização dos explantes (bordas).

Uma análise de regressão foi realizada para ambas as posições, e nenhum genótipo apresentou calogênese na ausência de BAP. No entanto, quando foi adicionado 1 mg.L⁻¹ de BAP ao meio de cultura MS, foi observado que apenas o genótipo 156 x 123 formou calos, para as duas posições do explante no meio de cultura. Na concentração de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, este mesmo genótipo foi o que apresentou maior porcentagem de calos formados por explante, quando estes foram cultivados com a face adaxial em contato com o meio de cultura, diferindo estatisticamente dos demais genótipos. Na concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP foi observado que os genótipos 156 x 123 e 309 formaram maior porcentagem de calos (Tabela 10). Estes calos apresentaram na maioria das vezes, um aspecto compacto e de coloração verde, formados sobre o limbo do explante quando cultivados em ambas as posições, abaxial e adaxial.

Estes resultados assemelham-se àqueles obtidos por RIBAS (2000), que observou após 7 dias de cultivo de materiais adultos, o início da formação de calos em meio MS suplementado com BAP. De forma semelhante, BIASI *et al.* (2000) observaram a proliferação de calos juntamente com o início da organogênese, após 18 dias de cultivo, na maioria dos explantes cultivados em meio MS com diferentes concentrações de BAP, incluindo o tratamento controle, sendo que a porcentagem máxima de calos foi obtida na concentração de 1,3 mg.L⁻¹ de BAP.

TABELA 10 – Médias da porcentagem de explantes foliares que formaram calos, para três genótipos de maracujá-amarelo: 309, 352 e 156 x 123, obtidas para quatro tratamentos e duas posições de cultivo do explante no meio de cultura.

Genótipos	BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		1.0		1.5		2.0	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
156 x 123	0,00 a	0,00 a	11,25 a	11,22 a	26,19 a	52,71 a	56,20a	56,3 a
309	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	34,50 a	34,46 b	52,71ab	52,8 ab
352	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	34,34 a	29,73 b	40,61 b	39,0 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

4.3 DISCUSSÃO GERAL SOBRE A ORGANOGÊNESE DE MATERIAL JOVEM E ADULTO

A organogênese a partir de explantes foliares de maracujá-amarelo apresentou algumas características comuns entre o material jovem, originário de sementes, e o material adulto. As duas posições do explante foram testadas, abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura, e foi observado que explantes jovens respondem bem à citocinina BAP em ambas as posições, exceto para a variável porcentagem de explantes que formaram calos.

Resultado diferente foi obtido para explantes foliares adultos. Neste caso, a organogênese foi favorecida quando a face adaxial do explante foi posta em contato com o meio de cultura. Este resultado confirma outros trabalhos que mostraram a eficiência desta face do explante no processo organogenético. Para explantes foliares de macieira cv. 'Hawai', também foi observado maior formação e crescimento de calos quando a face adaxial ficou em contato com o meio de cultura (FORTES, 1992). O mesmo comportamento foi observado por BIASI *et al.* (1994) para explantes de abacateiro, cv. 'Ouro Verde'. Este fato pode ser explicado pela ocorrência de um maior número de células responsivas e de receptores de membrana responsáveis pela resposta aos reguladores de crescimento, que atuam como sinais químicos de estímulo à diferenciação celular (De BONDT, 1995; SCHUCH, 2000).

O tratamento controle, sem BAP, mostrou-se ineficiente para a organogênese, além de ser observada pouca resposta dos tecidos ao meio de cultura MS, ocorrendo após alguns dias de cultivo a clorose e necrose de alguns explantes. A única exceção ocorreu para o número médio de gemas e folhas em explantes juvenis, em decorrência de uma possível reserva endógena de citocininas que estes explantes apresentariam no momento do cultivo, formada quando eles ainda estavam ligados à planta-mãe.

O início da resposta morfogênica foi evidenciada após dez a 15 dias de cultivo em meio de cultura MS com 1; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, para a maioria das variáveis avaliadas, em ambas as posições e para os dois tipos de estágio fisiológico do material. Este resultado foi acompanhado de um aumento na espessura dos tecidos, uma leve curvatura nas bordas dos explantes e o aparecimento das primeiras gemas adventícias aos 20 dias de cultivo no limbo dos explantes próximo a nervura central, e também nas extremidades. De modo geral, a resposta máxima de todas as variáveis foi obtida em meio MS adicionado de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. No entanto, para o comprimento das folhas e comprimento da haste principal no experimento com material jovem, e número médio de gemas no experimento com material adulto foi observado que a concentração de 1,3 mg.L⁻¹ de BAP resultou em valores máximos

das características nas curvas de regressão, apesar desta concentração não fazer parte dos tratamentos avaliados no presente trabalho. Explantes jovens regeneraram gemas adventícias na concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em 50,22% dos casos. Houve uma interação significativa entre as respostas obtidas pelos materiais adultos e os tratamentos com BAP. Os genótipos 309 e 156 x 123 foram os que apresentaram maior regeneração de gemas quando o explante foi cultivado com a face adaxial no meio de cultura. De modo semelhante, 156 x 123 quando cultivado na posição abaxial apresentou melhor resultado em relação aos demais genótipos, no entanto não houve diferença estatística significativa entre eles. Resultados semelhantes foram relatados por RIBAS (2000), que obteve a organogênese deste genótipo quando os explantes foram cultivados com a face adaxial em contato com o meio, utilizando porém 2 mg.L^{-1} de BAP.

Com exceção da variável porcentagem de explantes que formaram calos, as demais mostraram que a citocinina BAP na concentração de 2 mg.L^{-1} induz uma diminuição na resposta morfogênica dos tecidos. DORNELAS e VIEIRA (1994), e BIASI *et al.* (2000) relataram este efeito, associando concentrações elevadas de citocininas, superiores a 2 mg.L^{-1} , a um possível efeito tóxico às células vegetais.

Estes resultados mostraram que o genótipo, a idade fisiológica dos explantes, a concentração de BAP e a posição em que o explante é cultivado no meio de cultura exercem influência no processo de organogênese, e devem ser estudados com cautela. TORRES *et al.* (1998) relataram as possíveis interações entre estes fatores e que foram confirmadas no presente trabalho.

4.4 EXPERIMENTO DE ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS BROTOS DE MARACUJÁ – AMARELO REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.

Houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, para as variáveis comprimento de raízes, número de raízes e comprimento de haste. As duas repetições de cada experimento foram avaliadas individualmente e não foi encontrada diferença estatística entre elas. Houve 100% de enraizamento em ambos os tratamentos (Tabela 11).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o meio básico MS, com a concentração de sais reduzida à metade e com 1 mg.L^{-1} de GA_3 , proporcionou um maior alongamento dos brotos, visualizado pelo comprimento da haste, bem como um maior número de raízes por plântula alongada, uma vez que cada broto foi individualizado em tubo de ensaio e que todos formaram raízes. O regulador de crescimento GA_3 foi escolhido para

este trabalho, pelo seu efeito conhecido no alongamento de partes aéreas, principalmente quando as brotações a serem enraizadas são muito pequenas, fazendo-se necessária esta fase intermediária. Observou-se também que o comprimento destas raízes diferiu estatisticamente.

TABELA 11 – Efeito de dois tratamentos sobre o alongamento e enraizamento de brotos de maracujá-amarelo, regenerados a partir de explantes foliares, após sessenta dias de cultivo (média das duas repetições do experimento).

Tratamentos	Comprimento da haste (cm)	Número médio de raízes	Comprimento de raiz (cm)
MS/2 + 1 mg.L ⁻¹ GA ³	3,73 a	2,08 a	6,64 a
MS	1,45 b	1,36 b	3,75 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste de Duncan.

Outros trabalhos confirmam os resultados obtidos, onde a utilização do meio básico MS sem adição de auxinas ou outro regulador de crescimento torna-se suficiente para o alongamento das brotações e formação de raízes. Este artifício é utilizado para reduzir o efeito residual das citocininas, promovendo o alongamento das brotações que são individualizadas e transferidas para o meio de enraizamento. O mesmo resultado pode ser obtido quando o meio básico sofre uma redução na sua concentração de sais. Altas concentrações de sais tendem a inibir as fases de indução, iniciação e alongamento do enraizamento. (DORNELAS e VIEIRA, 1993; DORNELAS e VIEIRA, 1994; KAWATA *et al.*, 1995; FREITAS, 1997; FARIA e SEGURA, 1997; TORRES *et al.*, 1998; BIASI *et al.*, 2000; RIBAS, 2000).

4.5 EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO

4.5.1 Avaliação da resistência ao antibiótico canamicina

Neste experimento foi avaliada a resistência natural de explantes foliares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, ao antibiótico canamicina, após trinta dias de cultivo. A análise de variância mostrou que houve diferenças significativas entre os resultados dos tratamentos com as diferentes concentrações do antibiótico (Anexo 20).

A organogênese foi observada até a concentração de 50 mg.L⁻¹ de Km, com

redução de 27% na sobrevivência dos explantes, em média, em relação ao tratamento controle (MS + 1,5 mg.L⁻¹ BAP). Nenhum explante sobreviveu quando foi adicionado ao meio 100 mg.L⁻¹ de Km. Os tecidos tornaram-se cloróticos e necróticos ao final de trinta dias, confirmando a eficiência desta concentração, mencionada em outros trabalhos realizados com esta espécie (MANDERS *et al.*, 1994; SILVA, 1998) (Tabela 12). Os efeitos da canamicina e de outros antibióticos são frequentemente estudados, a fim de elucidar a tolerância natural dos tecidos à estes agentes seletivos da transformação e o efeito deles nos processos morfogenéticos (D'UTRA VAZ *et al.*, 1993).

TABELA 12 – Efeito da canamicina na porcentagem de sobrevivência de explantes foliares de maracujá – amarelo, após trinta dias de cultivo.

Tratamentos (mg.L ⁻¹ Km)	Sobrevivência (%)
Km 0	91,5 a
Km 50	64,5 b
Km 100	0,0 c

Médias seguidas por letras distintas, diferem estatisticamente em nível de 5% pelo teste Duncan

4.5.2 Experimento de co-cultura dos explantes

A análise de variância mostrou significância estatística para os quatro tratamentos (Anexo 21). Maior porcentagem de explantes sobreviventes foi obtida para o T0, onde os explantes não inoculados com a bactéria, regeneraram em meio MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ BAP, confirmando os dados obtidos nos experimentos de regeneração. Por outro lado, o tratamento T1 apresentou 0% de sobrevivência dos explantes não inoculados, uma vez que ao meio de cultura foi adicionado 100 mg.L⁻¹ de Km, resultado obtido anteriormente no experimento de resistência ao antibiótico canamicina.

Os explantes que foram submetidos ao processo de inoculação com a bactéria, e submetidos a 24 (T2) e 48 (T3) horas de co-cultura, respectivamente, em meio MS sólido sem adição de fitohormônios, apresentaram-se com um aspecto leitoso, mesmo após a lavagem com meio MS líquido, para retirar o excesso da solução bacteriana. Isso foi observado ao término das 24 e 48 horas, antes do transferência dos explantes para o meio seletivo com carbenicilina 500 mg.L⁻¹ e Km 100 mg.L⁻¹. Este aspecto foi observado também por SCHUCH (2000), que relatou a diminuição da capacidade regenerativa de explantes de macieira, diminuindo a taxa de sobrevivência e aumentando o tempo necessário para a regeneração. Os explantes submetidos a um período de 24 horas de co-cultura (T2),

apresentaram maior porcentagem de sobrevivência que aqueles submetidos ao tratamento T3 (48 h), onde foi possível observar, após trinta dias, em ambos os tratamentos, o início das primeiras gemas (Tabela 13).

TABELA 13 – Efeito do tempo de co-cultura na porcentagem de sobrevivência dos explantes foliares de maracujá-amarelo, após trinta dias.

Tratamentos	Sobrevivência dos explantes (%)
T0 (controle +)	90,0 a
T2 (24 h)	59,93 b
T3 (48 h)	31,52 c
T1 (controle -)	0,0 d

Médias seguidas por letras distintas, diferem estatisticamente em nível de 5% pelo teste de Duncan

4.5.3 Obtenção e avaliação das plantas resistentes à canamicina pela técnica de PCR

De 70 explantes de material jovem que foram inoculados com a bactéria contendo apenas o gene *nptII*, 9 brotos foram regenerados e enraizados em meio seletivo. Destes, 3 plantas foram PCR +, ou seja, apresentaram amplificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose, conferindo uma eficiência de transformação igual a 4,3%. Este cálculo foi feito com base no número de plantas PCR+ obtidas em relação ao total de explantes inoculados e co-cultivados em cada experimento (Tabela 14).

Estes explantes foram cultivados com a face abaxial em contato com o meio de cultura. De 70 explantes inoculados com a bactéria contendo o gene *antisense* da ACCO, 6 brotos foram regenerados e enraizados em meio seletivo. Destes, uma planta foi PCR+, o que mostra uma eficiência de transformação igual a 1,43%.

Estes resultados foram superiores aos encontrados por SILVA (1998), que utilizou o mesmo procedimento de cálculo para explantes foliares desta espécie, onde foi obtida uma eficiência de 2% na transformação com o gene *nptII*. MANDERS *et al.* (1994) obtiveram para o mesmo gene *nptII*, 4 plantas regeneradas e enraizadas em meio seletivo, sendo 3 PCR+. O padrão esperado para o tamanho dos fragmentos amplificados do gene *antisense* (850 pb), *sense* (1200 pb) e *nptII* (800pb) foi confirmado. Não foram observadas amplificações para o DNA das plantas não transformadas (Figuras 20, 21 e 22).

A *Agrobacterium tumefaciens* tem sido empregada com frequência nos protocolos de transformação genética de várias espécies, com bons resultados para a eficiência de

plantas transgênicas obtidas. Entre estas espécies encontra-se a macieira, onde explantes foliares foram submetidos a um pré-condicionamento em meio líquido antes da infecção com a bactéria. Esta metodologia induziu uma eficiência da transformação igual a 14,3%, considerada alta em relação a outros trabalhos para a mesma espécie (SCHUCH, 2000). A eficiência do uso da cepa desarmada EHA101 de *Agrobacterium*, assim como a vantagem da utilização de material jovem para a inoculação com a bactéria e posterior regeneração de gemas adventícias de macieira foram descritas por DE BONDT (1995). O autor observou que folhas com quatro semanas foram mais eficientes na transformação do que folhas mais velhas. De um total de 400 explantes foliares inoculados, apenas três explantes foram confirmados como transgênicos por PCR.

Um trabalho pioneiro no processo de transformação genética de cultivares de melão com o gene antisense da enzima ACCO foi o realizado por AYUB *et al.* (1996). Quatro linhagens foram confirmadas pelos autores como sendo transgênicas. Destas, três mostraram redução significativa na produção de etileno em folhas e frutos. De forma semelhante, o plasmídeo pGA643 contendo o gene da enzima ACCO, que foi isolado de maçã, foi inserido em explantes foliares de melão com uma eficiência de transformação de 3% (SILVA, 2000).

Explantes foliares de amora (*Rubus idaeus* L.) obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação foram infectadas pela cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os genes *nptII* e *gus*. Durante quatro semanas os explantes foram cultivados em meio de indução de gemas contendo TDZ, AIB e o antibiótico cefotaxima. Os brotos formados foram transferidos para o meio de organogênese contendo cefotaxima e canamicina por mais duas semanas. Os autores observaram que a utilização de 40 mg.L⁻¹ de Km reduziu a capacidade regenerativa dos explantes. A eficiência de transformação obtida foi de 0,3% (FARIA *et al.*, 1997), valor inferior ao obtido por GRAHAM *et al.* (1990) para a mesma espécie, onde a eficiência foi de 12,72%.

Hipocótilos de ameixa (*Prunus domestica*) foram utilizados em um experimento de transformação genética via *A. tumefaciens*, cepa EHA 101, contendo os plasmídeos pCGN7001 e pCGN7314 com os genes *nptII* e *gus*. Os explantes foram co-cultivados em meio de cultura MS contendo AIB, TDZ e uma solução da bactéria por 48 a 72 h, em um *shaker* com rotação lenta à temperatura ambiente. Após o período de co-cultivo os explantes foram lavados em meio de cultura líquido MS contendo os antibióticos carbenicilina e cefotaxima, e então cultivados em meio próprio para a indução de gemas contendo os mesmos antibióticos e 75 mg.L⁻¹ de Km. Após quatro semanas e cinco sub-cultivos os brotos enraizaram. Uma eficiência de transformação de 16,6% foi obtida (MANTE

et al., 1991).

TABELA 14 – Porcentagem de plantas PCR +, de *P. edulis* f. *flavicarpa*, obtidas a partir da inoculação dos explantes com a cepa EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo os genes *nptII* e *antisense* da ACCO.

Gene	Nº plantas avaliadas	Nº plantas PCR +	% Plantas PCR +
<i>nptII</i>	09	03	33,3
LEM 1 (<i>Antisense</i> da ACCO)	06	01	16,6

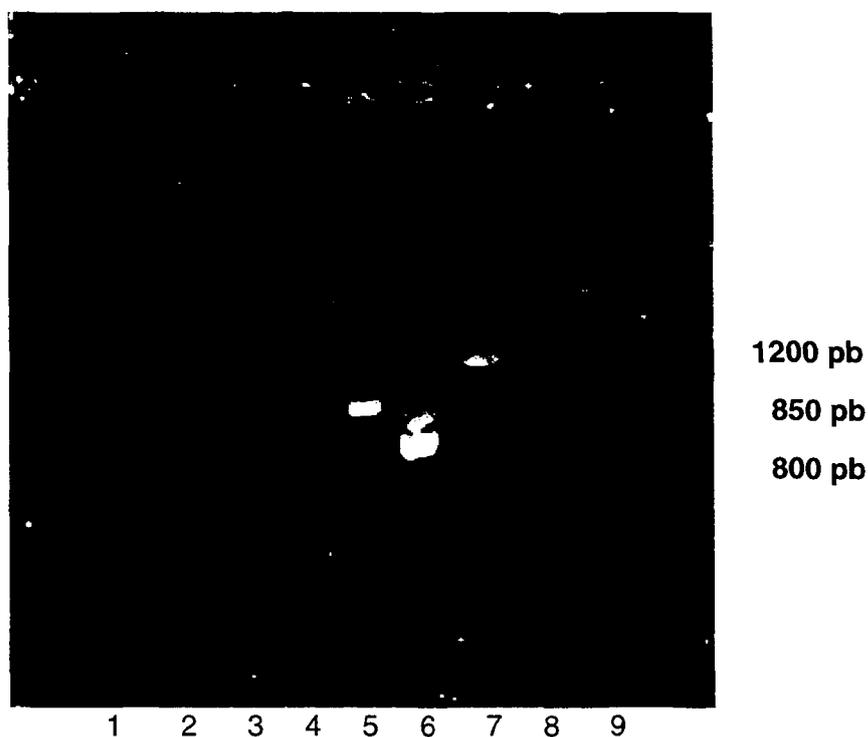


FIGURA 20 – Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primers específicos dos genes *sense* (1200 pb) e *antisense* (850 pb) da enzima ACCoxidase, e *nptII* (800 pb). 1: marcador λ Hind III; 2: planta regenerada de maracujá (ACCO *antisense*); 3: planta regenerada de maracujá (ACCO *sense*); 4: planta regenerada de maracujá (*nptII*); 5: plasmídeo pGA643 (ACCO *antisense*); 6: plasmídeo pGA643 (*nptII*); 7: controle, melão *Cantaloupe* (ACCO *sense*); 8: controle, melão *Cantaloupe* (ACCO *antisense*); 9: controle, melão *Cantaloupe* (*nptII*).

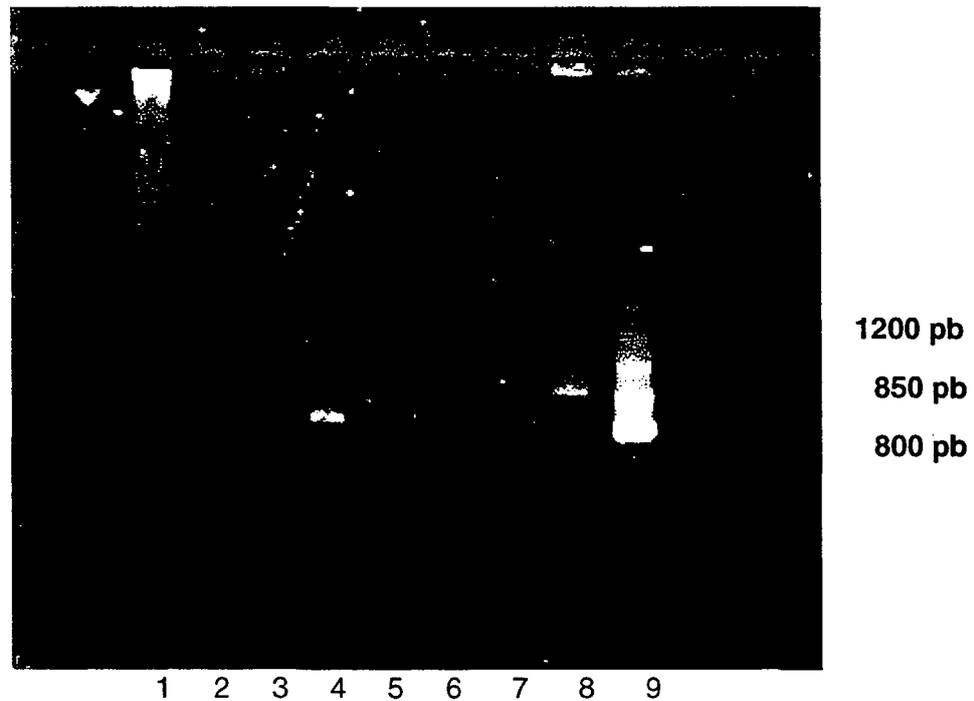


FIGURA 21 – Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primers específicos dos genes *sense* (1200 pb) e *antisense* (850 pb) da enzima ACCOxidase, e *nptII* (800 pb). 1: marcador λ /Hind III; 2: controle, melão *Cantaloupe* (ACCO *antisense*); 3: controle, melão *Cantaloupe* (ACCO *sense*); 4: controle, melão *Cantaloupe* (*nptII*); 5: planta regenerada de maracujá (ACCO *antisense*); 6: planta regenerada de maracujá (ACCO *sense*); 7: planta regenerada de maracujá (ACCO *antisense* + *nptII*); 8: plasmídeo pGA643 (ACCO *antisense*); 9: plasmídeo pGA643 (ACCO *antisense* + *nptII*).

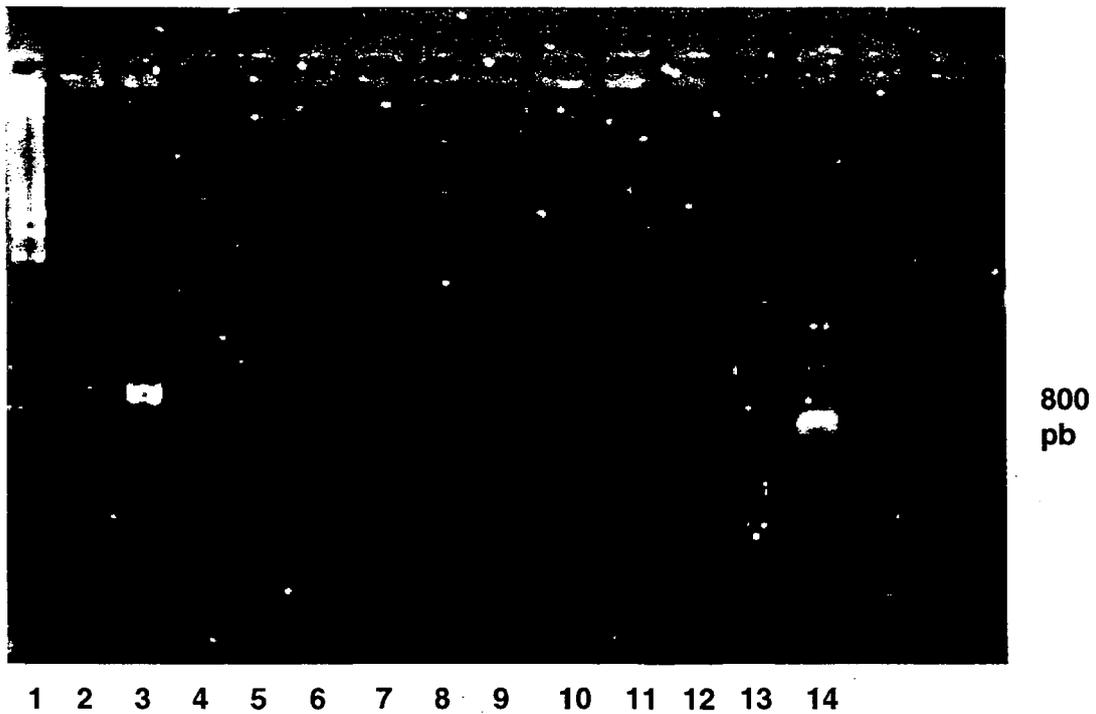


FIGURA 22 – Amplificação de fragmentos por PCR, utilizando primer específico do gene *nptII* (800 pb). 1: marcador λ /Hind III; 2 e 3: plantas regeneradas de maracujá (*nptII*); 4 a 13: plantas regeneradas, PCR negativo; 14: planta regenerada de maracujá (*nptII*).

4.6 ANÁLISE COLORIMÉTRICA DE FRUTOS COMERCIAIS DE MARACUJÁ – AMARELO.

Os três frutos do grupo 01 foram identificados como sendo predominantemente verdes, de acordo com os valores absolutos obtidos. Os frutos do segundo grupo foram classificados como predominantemente coloridos, ou seja, em um estágio intermediário da maturação, e os frutos do terceiro grupo foram identificados como totalmente coloridos, apresentando-se portanto em início da senescência (Tabela 15, Figura 23). Com base nestes resultados, foi realizada a avaliação da produção de etileno.

TABELA 15 – Valores absolutos da cor de frutos comerciais de maracujá – amarelo, classificados em três grupos: predominantemente verde, predominantemente colorido e totalmente colorido, obtidos por colorimetria.

Grupos	Valor L	Valor a	Valor b
Predominantemente verde	58,29	- 7,76	+ 40,59
Predominantemente colorido	73,57	+ 0,12	+ 48,39
Totalmente colorido	74,89	+ 3,06	+ 57,45

L= luminosidade; a= variação na cor entre verde e vermelho; b= variação na cor entre azul e amarelo.



FIGURA 23 – Frutos comerciais de maracujá-amarelo classificados por colorimetria em três grupos, de acordo com o estágio de maturação. 1: predominantemente verde; 2: predominantemente colorido; 3: totalmente colorido.

4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETILENO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACCO, EM FRUTOS DE MARACUJÁ – AMARELO.

Frutos comerciais de maracujá, agora identificados em três grupos de acordo com o grau de maturação, foram analisados em atmosfera ambiente, para a atividade enzimática da ACCO e produção de etileno. Foi detectada a atividade da enzima ACCO em maracujás predominantemente verdes, com valores superiores em relação aos frutos maduros. Maior produção de etileno foi encontrada também para estes frutos, com um valor médio de 7,25 nL.g⁻¹.h⁻¹, bem acima do nível máximo estabelecido para espécies classificadas como fracamente produtoras de etileno (0,5 nL.g⁻¹.h⁻¹) (ABELES, 1992). Por outro lado, nestes frutos, a adição de 250 µM de ACC ao extrato solúvel, triplicou a atividade da ACCO de 10,10 nL. µg⁻¹.h⁻¹ para 37,84 nL. µg⁻¹.h⁻¹ indicando que a produção de etileno ainda é limitada pela concentração de substrato e que os co-fatores sulfato ferroso (10µL), ascorbato de sódio (30mM) e bicarbonato de sódio (30mM), foram necessários para a obtenção de uma atividade máxima da enzima ACCO na reação (Tabelas 16 e 17) .

TABELA 16 – Produção de etileno nos frutos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., determinada após 1 e 2 horas por cromatografia gasosa.

Estádio de maturação	Peso dos frutos (g)	Média da produção de etileno após 1 e 2 h (nL.g ⁻¹ .h ⁻¹)
Predominantemente verde	750	7,25
Predominantemente colorido	741	5,43
Totalmente colorido	674	5,24

Com a obtenção destes resultados foi possível determinar que os frutos de maracujá-amarelo diferem quanto à produção de etileno e atividade da enzima ACCO, de acordo com o grupo de maturação. Desta forma, foram considerados produtores intermediários de etileno em comparação com outras espécies, assemelhando-se a algumas cultivares de tomate, maçã, melão, pêssego, pêra, ameixa, caqui e kiwi (ZIMMER, 1998). No entanto, existem diferenças quanto à produção de etileno e atividade da ACCO entre espécies do gênero *Passiflora*. Um estudo realizado com frutos de maracujá-roxo (*P. edulis* Sims) mostrou que a produção de etileno (0,12 nmoL etileno.g⁻¹.h⁻¹), conteúdo de ACC e atividade da enzima ACCS foi baixa no estágio inicial de maturação. Estes resultados indicaram que

esta espécie apresenta a mesma rota de biossíntese de etileno de outros frutos climatéricos e que a atividade da enzima ACCS é limitada. Por outro lado, a atividade da enzima ACCO encontrada neste estudo foi elevada e superior a outras espécies. Estes níveis elevados resultam na produção de grandes quantidades de etileno durante à pós-colheita de frutos (SHIOMI *et al.*, 1996).

TABELA 17 – Atividade da enzima ACCO em frutos de maracujá-amarelo obtida pela produção de etileno, determinada por cromatografia gasosa.

Estádio de maturação	Média da Atividade da ACCO com ACC e cofatores após 1 hora (nL etileno/g polpa)	Média da Atividade da ACCO sem ACC e cofatores após 1 h (nL etileno/g polpa)	Testemunha (nL etileno/g polpa)
Predominantemente verde	37,84	10,10	1,17
Predominantemente colorido	23,70	4,50	1,62
Totalmente colorido	22,69	3,94	0,18

5 CONCLUSÕES

A análise e interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

1) A organogênese a partir de explantes foliares de maracujá - amarelo é possível e é dependente da posição em que os explantes são cultivados no meio de cultura. Explantes originários de plantas adultas apresentam maior porcentagem de gemas quando cultivados na posição adaxial, ao passo que explantes isolados de material jovem formam gemas em ambas as posições, abaxial e adaxial de cultivo, iniciando o processo de organogênese aos 15 e 20 dias de cultivo.

2) A concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP foi a que induziu os melhores resultados em termos de porcentagem de explantes com gemas, número médio de gemas por explante, número médio de folhas por explante, comprimento médio das folhas, comprimento da haste principal. A concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP causou uma diminuição na resposta regenerativa, além de promover uma formação excessiva de calos.

3) O protocolo utilizado para a transformação genética de maracujá – amarelo, via *Agrobacterium tumefaciens*, possibilita a inserção dos genes *nptII* e *antisense* da enzima ACCO do melão. Estes resultados foram confirmados pela técnica de *PCR*.

4) A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é considerada, em comparação com outras espécies, produtora intermediária de etileno. A atividade enzimática da ACCO é maior em frutos predominantemente verdes, classificados desta forma por colorimetria, mas ela é limitada e necessita de cofatores para sua atividade máxima.

A continuidade deste trabalho com a determinação da produção de etileno em folhas e frutos transgênicos, será de grande importância para elucidarmos as bases bioquímicas envolvidas no processo de maturação de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. Jr. **Ethylene in plant biology**. 2ª ed. San Diego: San Diego Academic Press, 1992. 414 p.
- 2 AN, G.; EBERT, P.; MITRA, A.; HA, S. Binary vectors. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R. A. (Eds.) **Plant molecular biology manual**. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers, p. A3/1-A3/19, 1988.
- 3 AYUB, R.; GUIIS, M.; BEN AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAIN, J. P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. P. Expression of ACC oxidase *antisense* gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 2-6, 1996.
- 4 BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Calogênese em abacateiro 'Ouro Verde' a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 2, p. 25-30, 1994.
- 5 BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p. 661-665, 2000.
- 6 BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, UFV, 1997. 547p.
- 7 BOUZAYEN, M.; FERRER, M.; GUILLEN, P.; AYUB, R.; BIDONDE, S.; BEN AMOR, M.; GUIIS, M.; RAMASSAMY, S.; ZEGZOUTI, H.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A. ACC oxidase gene family: characterization and down – regulation by genetic manipulation. **Phytochemistry of Fruit and Vegetables**, Oxford, p.243-250, 1997.
- 8 BRASILEIRO, A. C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CENARGEN, 1998. 309p.
- 9 BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium* - hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CENARGEN, 1998. p.75-92.
- 10 BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de planta**. Brasília: SRI/EMBRAPA-CNPq, 1999. p.679-736.

- 11 DE BONDT, A. **Molecular breeding of apple (*Malus x domestica* Borkh.) via *Agrobacterium tumefaciens* for increased fungal resistance.** Leuven: 1995. 103p. (Dissertationes de Agricultura) Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica.
- 12 DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P.amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v. 13, p.103-106, 1993.
- 13 DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands, v. 36, p.211-217, 1994.
- 14 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- 15 DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.26, p.23-27, 1991.
- 16 DUPILLE, E.; ROMBALDI, C. V.; LELIEVRE, J. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; PECH, J.C.; LATCHÉ, A. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. **Planta**, v.190, p.65-70, 1993.
- 17 D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P.; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.
- 18 FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **Hort Science**, v.32, n.7, p.1276-1277, 1997.
- 19 FARIA, M. J. S. S.; DONNELLY, D. J.; COUSINEAU, J. C. Adventitious shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of Red Raspberry. **Arq. Biol. Technology**, v.40, n.3, p.518-529, 1997.
- 20 FERRADINI, N.; FAMIANI, F.; PROIETTI, P.; STANICA, F. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M-26 apple rootstock. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.6, p.865-895, 1996.
- 21 FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

- 22 FNP Consultoria. Disponível em < <http://www.fnp.com.br/fnp/left.html> >. Acesso em 23 março de 2001.
- 23 FORTES, G. R. L. **Calogênese e organogênese in vitro de macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. Viçosa, 1992. 163p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa.
- 24 FREITAS, I. M. N. Micropropagação in vitro de maracujazeiro. In: I CONGRESSO IBEROAMERICANO E III CONGRESSO IBÉRICO DE CIÊNCIAS HORTÍCOLAS, 18., 1997, Vilamoura, Portugal. **Acta de Horticultura**. P.103-107.
- 25 GAMA, M. I. C. S. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa-SPI/Embrapa-CENARGEN, 1998. 309p.
- 26 GELVIN, S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.51, p.223-256, 2000.
- 27 GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba:Nobel, 1970. 430p.
- 28 GORNY, J. R.; KADER, A. A. Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.122, n.4, p.542-546, 1997.
- 29 GRAHAM, J.; McNICOL, R. J.; KUMAR, A. Use of the *gus* gene as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Rubus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, p. 35-39, 1990.
- 30 GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- 31 GRIERSON, D. Manipulation of fruit ripening by genetic modification. **Transgenic Plant Research**, Durham, p.109-124, 1998.
- 32 GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1998. 856 p.
- 33 GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.2, p.533-568.

- 34 GUIB, M.; BOUQUIN, T.; ZEGZOUTI, H.; AYUB, R.; BEN AMOR, M.; LASSERE, E.; BOTONDI, R.; RAYNAL, J.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; BALAGUE, C.; PECH, J. C. Differential expression of ACC oxidase genes in melon and physiological characterization of fruit expressing an antisense ACC oxidase gene. **Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene**, Toulouse, 1996.
- 35 GUIB, M.; BEN AMOR, M.; BOTONDI, R.; AYUB, R.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Ethylene and biotechnology of fruit ripening: pre and postharvest behaviour of transgenic melons with inhibited ethylene production. In: 8^o INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT BIOREGULATORS IN FRUIT PRODUCTION, 463., 1997 a, **Acta Horticulturae**, p.31-37.
- 36 GUIB, M.; BOTONDI, R.; BEN AMOR, M.; AYUB, R.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. **J. Amer. Soc. Hort Sci.**, v.122, n.6, p.748-751, 1997 b.
- 37 HAMILTON, A. J.; LYCETT, G. W.; GRIERSON, D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 284-287, 1990.
- 38 HANDRO, W.; FLOH, E. I. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990, p. 203-212.
- 39 HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- 40 HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p.15-38, 1992.
- 41 HORSCH, R. B.; FRY, J.; HOFFMANN, N.; EICHHOLTZ, D. J.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985.
- 42 JOHN, I.; DRAKE, R.; FARREL, A.; COOPER, W.; LEE, P.; HORTON, P.; GRIERSON, D. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. **The Plant Journal**, v. 7, n.3, p.483-490, 1995.

- 43 JOSÉ, A. R. S.; BRUCKNER, C. H.; MANICA, I.; HOFFMAN, M. **Maracujá: temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia**. Porto Alegre: IVO MANICA (ed), 1997. 72p.
- 44 KADER, A. A.; ZAGORY, D.; KERBEL, E. L. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Davis, Califórnia, 29p., 1989.
- 45 KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia. **J. Plant Physiol.**, v.147, p.281-284, 1995.
- 46 LACORTE, C. **Suscetibilidade de *Arachis hypogaea* L. (amendoim) à transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens***. Rio de Janeiro, 1991. 96p. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 47 LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T.C. (Eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa-SPI/Embrapa-CENARGEN, 1998. 309p.
- 48 LASSERE, E.; BOUQUIN, T.; HERNANDEZ, J. A.; BULL, J.; PECH, J. C.; BALAGUÉ, C. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). **Molecular and General Genetics**, v.257, p. 81-90, 1996.
- 49 LIMA, A.A.; FILHO, H. P. S.; FANCELLI, M.; SANCHES, N. F.; BORGES, A. L. A cultura do maracujá. **Coleção PLANTAR**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. Brasília: EMBRAPA-SPI. 1994. 74p.
- 50 LIN, J. J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Focus**, v.16, p.72-77, 1994.
- 51 MANDERS, G.; OTONI, W. C.; D'UTRA VAZ, F. B.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.697-702, 1994.
- 52 MANTE, S.; MORGENS, P. H.; SCORZA, R.; CORDTS, J. M.; CALLAHAN, A. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of Plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. **Biotechnology**, v. 9, p. 853-857, 1991.

- 53 MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. Cap. 5, p. 101-158.
- 54 MARGARA, J. **Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: Los meristemas y la organogénesis**. Vs. Espanhola Box, J. e Terron, U. ed. Mundi-Prensa, 1988.
- 55 MORAN ROBLES, M. J. Multiplication végétative, in vitro, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. molissima* Bailez. **Fruits**, v.33, p.693-699, 1978.
- 56 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- 57 NAKATSUKA, A.; SHIOMI, S.; KUBO, Y.; INABA, A. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. **Plant Cell Physiol.**, v.38, n.10, p.1103-1110, 1997.
- 58 NAKAYAMA, F. Cultivo in vitro de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata**, v.42, p.63-74, 1966.
- 59 PECH, J. C.; BALAGUE, C.; ROMBALDI, C.; LASSERE, E.; BOUQUIN, T.; DUPILLE, E.; AYUB, R.; GUIZ, M.; ZEGZOUTI, H.; HERNANDEZ, J.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Cellular and molecular aspects of ethylene biosynthesis. **Plant Sciences**, Saint Malo, v.12-14, p.65-66, 1994.
- 60 PECH, J. C.; LASSERE, E.; AYUB, R.; GUIZ, M.; BIDONDE, S.; HERNANDEZ, J. A.; RAMASSAMY, S.; ROMBALDI, C.; BOUZAYEN, M.; BALAGUE, C.; LATCHÉ, A. Involvement of ethylene in fruit ripening. Expression and control of ACC oxidase gene. **Aust. J. Exp. Agr.**, p.1-4, 1995.
- 61 PETERS, J. A.; ROMBALDI, C.; SILVA, J. A.; SCHUCH, M. W. Transformação genética do meloeiro e da macieira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.11, p.10-13, 1999.
- 62 RIBAS, A. F. **Estudos sobre cultura de tecidos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)** Curitiba, 2000. 48p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- 63 ROMBALDI, C.; LELIEVRE, J. M.; LATCHÉ, A.; PETITPREZ, M.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Immunocytolocalization of 1-aminocyclopropane –1- carboxylic acid oxidase in tomato and apple fruit. **Planta**, v.92, p.453-460, 1994.

- 64 SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4ªed. Califórnia:Wadsworth Publishing Company Belmont. 1991, 682p.
- 65 SCHRODER, G.; WAFFENSCHMIDT, S.; WEILER, E. W.; SCHRODER, J. The region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. **Eur.J.Biochem**, v.138, n.2, p.387-391, 1984.
- 66 SCHUCH, M. W. **Regeneração e transformação de macieira, cultivar Gala, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, visando a obtenção de plantas com o gene antisense da ACC oxidase**. Pelotas, 2000. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia, Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- 67 SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA Transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, p.1699-1710, 1996.
- 68 SHIOMI, S.; KUBO, Y.; WAMOCHO, L. S.; KOAZE, H.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.8, p.199-207, 1996.
- 69 SILVA, J. A. **Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese da ACC oxidase em frutos climatéricos**. Pelotas, 2000. 128p. Tese (Doutorado em Biotecnologia, Ciências). Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- 70 SILVA, M. B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, 1998. 36p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa.
- 71 SMITH, M. K.; DREW, R. A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.17, p.267-289, 1990.
- 72 SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179p.
- 73 THEOLOGIS, A.; ZAREMBINSKI, T. I.; OELLER, P. W.; LIANG, X.; ABEL, S. Modification of fruit ripening by suppressing gene expression. **Plant Physiol.**, v.100, p.549-551, 1992.
- 74 THOMASHOW, L. S.; REEVES, S.; THOMASHOW, M. F. Crown gall oncogenesis:evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indolacetic acid. **Proc. Natl. Academic Science**. USA, v. 81, n. 16, p. 5071-5075, 1984.

- 75 TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1 e 2. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. 2v (864p).
- 76 VERVERIDIS, P.; JOHN, P. Complete recovery *in vitro* of ethylene forming enzyme activity. **Phytochemistry**, v. 30, p. 725-727, 1991.
- 77 VERVLIT, G.; HOLSTERS, M.; TEUCHY, H.; MONTAGU, M. VAN.; SCHELL, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. **Journal of General Virology**, v.26, p.33-48, 1975.
- 78 YANG, S. F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.155-189, 1984.
- 79 ZIMMER, P. D. **Caracterização parcial da ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) oxidase em frutos climatéricos**. Pelotas, 1998. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agro-industrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- 80 ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST: Sistema de análise estatística para computador**. Registrado na Secretaria Especial de Informática (SEI), sob nº 066-060-categoria A, Pelotas, 1984.

ANEXOS

ANEXO 1 – Análise de variância conjunta para a porcentagem de explantes com gemas, de material juvenil de maracujá-amarelo, cultivados nas posições abaxial e adaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	69,55	0,28 ^{ns}
BAP	3	5542,0	22,24 ^{**}
Posição x BAP	3	205,51	0,82 ^{ns}
Resíduo	24	249,17	
C.V. (%)			45

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 2 – Análise de variância conjunta para o número médio de gemas por explante de material juvenil de maracujá – amarelo, cultivados na posição abaxial e adaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,01	1,12 ^{ns}
BAP	3	0,34	31,52 ^{**}
Posição x BAP	3	0,01	1,01 ^{ns}
Resíduo	24	0,01	
C.V.(%)			11

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ns= não significativo

ANEXO 3 – Análise de variância individual para o número médio de gemas por explante de material juvenil de maracujá – amarelo, cultivados na posição abaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	0,16	8,36 ^{**}
Resíduo	12	0,02	
C.V.(%)			14

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 4 – Análise de variância individual para o número médio de gemas por explante de material juvenil de maracujá-amarelo, cultivados na posição adaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	0,19	66,22 ^{**}
Resíduo	12	0,00	
C.V.(%)			5,6

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 5 – Análise de variância conjunta para o número médio de folhas por explante de material juvenil de maracujá – amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,06	2,21 ^{ns}
BAP	3	1,03	38,26 ^{**}
Posição x BAP	3	0,04	1,30 ^{ns}
Resíduo	24	0,03	
C.V.(%)			14

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 6 – Análise de variância conjunta para o comprimento médio de folhas por explante de material juvenil de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,40	0,62 ^{ns}
BAP	3	1,34	2,07 ^{ns}
Posição x BAP	3	0,72	1,12 ^{ns}
Resíduo	24	0,64	
C.V.(%)			17

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 7 – Análise de variância individual para o comprimento médio de folhas por explante de material juvenil de maracujá-amarelo, cultivado na posição abaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	0,51	8,66 ^{**}
Resíduo	12	0,06	
C.V.(%)			68

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 8 - Análise de variância individual para o comprimento médio de folhas por explante de material juvenil de maracujá-amarelo, cultivado na posição adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	1,56	1,26 ^{ns}
Resíduo	12	1,24	
C.V.(%)			66

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 9 - Análise de variância conjunta para o comprimento da haste principal, de material juvenil de maracujá-amarelo, posições abaxial e adaxial de cultivo.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,11	2,20 ^{ns}
BAP	3	1,31	25,65 ^{**}
Posições x BAP	3	0,03	0,74 ^{ns}
Resíduo	24	0,05	
C.V. (%)			56

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 10 – Análise de variância para a porcentagem de explantes juvenis de maracujá-amarelo que formaram calos, cultivados na posição abaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	5471,34	183,55 ^{**}
Resíduo	12	29,81	
C.V.(%)			13

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 11 – Análise de variância para a porcentagem de explantes juvenis de maracujá-amarelo que formaram calos, cultivados na posição adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	3149,92	16,31 ^{**}
Resíduo	12	193,06	
C.V.(%)			66

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 12 - Análise de variância conjunta para a porcentagem de explantes juvenis de maracujá-amarelo que formaram calos, cultivados nas posições abaxial e adaxial de cultivo.

Causas da Variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	3523,72	31,62 **
BAP	3	8101,65	15,59 *
Posição x BAP	3	519,59	4,66 *
Resíduo	24	111,43	
C.V. (%)			33

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ANEXO 13 - Análise de variância conjunta para a porcentagem de explantes com gemas, de material adulto de maracujá-amarelo, cultivados nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	349,75	8,57 **
BAP	3	13222,37	323,97 **
Genótipo	2	111,42	2,73 ^{ns}
Posição x BAP	3	208,61	6,90 **
Posição x Genótipo	2	151,69	3,71 *
BAP x Genótipo	6	155,94	3,82 **
Posição x BAP x Genót.	6	177,37	4,34 **
Resíduo	72	40,82	
C.V.(%)			20

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5%

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 14 - Médias dos genótipos obtidas para a porcentagem de explantes com gemas, nas três concentrações de BAP e para as posições abaxial e adaxial de cultivo.

Genótipos	BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		1.0		1.5		2.0	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
309	0,0 a	0,0 a	33,0 a	33,0 a	43,5 b	78,8 a	36,2 a	36,2 a
156 x 123	0,0 a	0,0 a	28,0 a	29,9 a	59,0 a	64,3 b	31,6 a	31,4 a
352	0,0 a	0,0 a	34,6 a	36,2 a	48,0 b	49,5 c	31,4 a	31,6 a

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem estatisticamente em nível de significância de 5% pelo teste Duncan.

ANEXO 15 – Análise de variância conjunta para o número médio de gemas por explante, material adulto de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,01	5,85 *
BAP	3	0,55	245,15 **
Genótipo	2	0,00	1,55 ^{ns}
Posição x BAP	3	0,01	4,37 **
Posição x Genótipo	2	0,00	2,15 ^{ns}
BAP x Genótipo	6	0,01	3,86 **
Posição x BAP x Genót.	6	0,00	2,70 *
Resíduo	72	0,00	
C.V.(%)			5,3

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5%

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 16 – Análise de variância conjunta para o número médio de folhas por explante, material adulto de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,01	1,45 ^{ns}
BAP	3	3,24	324,36 **
Genótipo	2	0,04	3,72 *
Posição x BAP	3	0,11	11,32 **
Posição x Genótipo	2	0,02	2,38 ^{ns}
BAP x Genótipo	6	0,06	5,97 **
Posição x BAP x Genót.	6	0,03	2,95 *
Resíduo	72	0,01	
C.V.(%)			8,8

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5%

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 17 – Análise de variância conjunta para o comprimento médio de folhas por explante, material adulto de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,14	7,53 **
BAP	3	2,05	108,77 **
Genótipo	2	0,02	1,49 ^{ns}
Posição x BAP	3	0,11	6,00 **
Posição x Genótipo	2	0,02	1,16 ^{ns}
BAP x Genótipo	6	0,01	0,91 ^{ns}
Posição x BAP x Genót.	6	0,04	2,58 *
Resíduo	72	0,02	
C.V.(%)			48

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5%

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 18 – Análise de variância conjunta para o comprimento da haste principal por explante, material adulto de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	0,73	20,27 **
BAP	3	5,45	150,60 **
Genótipo	2	0,01	0,38 ^{ns}
Posição x BAP	3	0,69	19,01 **
Posição x Genótipo	2	0,09	2,64 ^{ns}
BAP x Genótipo	6	0,18	5,02 **
Posição x BAP x Genót.	6	0,08	2,27 *
Resíduo	72	0,03	
Média Geral (cm)			0,45
C.V.(%)			42

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo em nível de 5%

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 19 – Análise de variância conjunta para a porcentagem de explantes com calos; material adulto de maracujá-amarelo, cultivado nas posições abaxial e adaxial.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
Posição	1	68,33	0,66 ^{ns}
BAP	3	14042,42	136,85 ^{**}
Genótipo	2	620,46	6,04 ^{**}
Posição x BAP	3	84,50	0,82 ^{ns}
Posição x Genótipo	2	151,47	1,47 ^{ns}
BAP x Genótipo	6	144,19	1,40 ^{ns}
Posição x BAP x Genót.	6	138,27	1,34 ^{ns}
Resíduo	72	102,60	
C.V.(%)			45

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= Coeficiente de Variação

ns = não significativo

ANEXO 20 – Análise de variância para a resistência de explantes foliares de maracujá-amarelo, ao antibiótico canamicina.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	2	31544,12	420,86 ^{**}
Resíduo	57	74,95	
C.V.(%)			19,7

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= coeficiente de variação

ANEXO 21 - Análise de variância para a co-cultura de explantes foliares de maracujá-amarelo, após 30 dias.

Causas da variação	GL	QM	Valor F
BAP	3	14847,09	496,45 ^{**}
Resíduo	36	29,90	
C.V.(%)			12,05

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

C.V.= coeficiente de variação