

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANDREDY MURILO TRINDADE AMORIM

Reversão à juvenilidade em *Passiflora edulis* SIMS

Piracicaba  
2019



ANDREDY MURILO TRINDADE AMORIM

Reversão à juvenilidade em *Passiflora edulis* SIMS  
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Pinheiro Martinelli

Piracicaba  
2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Amorim, Andredy Murilo Trindade

Reversão à juvenilidade em *Passiflora edulis* SIMS / Andredy Murilo Trindade Amorim; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

93 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Ápices caulinares 2. Benziloaminopurina (BAP) 3. Brotos adventícios 4. Folhas lanceoladas 5. Maracujá 6. Rejuvenescimento *in vitro*. I. Título.

CDU 631.538 : 634.776.3

**Elaborada por:**

Marilia Ribeiro Garcia Henyei  
CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

À Deus, meu refúgio e minha fortaleza, o único digno de toda honra, glória e louvor,  
o meu Redentor que vive e reina para todo o sempre. Toda a terra te adorará e te  
cantará louvores.

À minha família, grandes inspirações em minha vida.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus pelo seu amor imensurável, graça e infinita misericórdia, pelo dom da vida, pela sabedoria a mim instruída por Ele, por minhas conquistas pessoais e profissionais durante esse ciclo do mestrado, por todas as vitórias alcançadas e livramentos concedidos, pelo que o SENHOR já fez e ainda fará em minha vida.

Aos meus pais, Albertino Rios Amorim e Eletéia Mônica Trindade Amorim, e avó Enedina dos Santos Trindade, pelo amor, por todos os ensinamentos e caráter que tenho graças a vocês que estão sempre ao meu lado, pelo apoio e incentivo em tudo e pelo esforço sem medidas para que eu pudesse chegar até aqui.

À Professora Adriana Pinheiro Martinelli, por me oferecer a oportunidade em orientar-me no curso de mestrado, por sua paciência e conselhos, além de contribuir para minha formação científica e profissional através dos seus conhecimentos, incentivo e apoio constantes.

Ao Professor Marcelo Carnier Dornelas, do Instituto de Biologia da UNICAMP. Pela colaboração no projeto de mestrado, além de me ajudar com as dúvidas que apareciam ao longo da pesquisa, através dos seus conhecimentos sobre a área de estudo e também pelo rico conteúdo das disciplinas ofertadas que puderam acrescentar em meu aprendizado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Código de financiamento 001).

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP) onde foi possível o desenvolvimento dos experimentos.

À bióloga Mônica Lanzoni Rossi, pela amizade, pelo conhecimento transmitido e pela ajuda na condução das técnicas e análises microscópicas, além da confecção de pranchas com excelente qualidade para este trabalho. Pelo apoio e suporte neste ciclo de mestrado, com toda a dedicação e competência.

Ao biólogo Marcelo Favaretto Côrrea, pela amizade, pelo apoio nos experimentos, disponibilidade de tempo e auxílio nas coletas de campo, manutenção das plantas, e conhecimento transmitido em Práticas de Cultura de Tecidos.

Aos técnicos de laboratório Cleusa Cabral e Joaquim Everaldo, pela amizade, apoio e ajuda no cultivo das plantas na casa de vegetação do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas.

Ao Professor José Lavres Junior, do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pela amizade, apoio e pela disponibilização da casa de vegetação para o cultivo das plantas.

Aos colegas de trabalho, Tati, Aline, Mônica Laís, Mayra, Carol, Sílvia, Andreia, Sandra, Leonardo e Joaquim que me ajudaram na condução deste trabalho, pela amizade, pela disponibilidade de tempo, auxílio, contribuição e convívio agradável.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ) sob coordenação do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela disponibilização do microscópio eletrônico de varredura para a obtenção das micrografias eletrônicas.

À minha esposa Camila Amorim, pelo amor, carinho, apoio, incentivo e compreensão, que sempre esteve ao meu lado, mesmo a quilômetros de distância e por muitos meses, encorajando-me a cada dia com palavras de motivação. Obrigado meu amor!

Aos amigos, Mayara, Deyvid e Fernando, pelas conversas descontraídas e bons momentos, conselhos e muita música, além de grande ajuda e suporte em diversas ocasiões.

Aos colegas de apartamento, Sales, Alex, Angelica, Silvio e Abraão.  
Aos irmãos da igreja Bereana Piracicaba que me receberam e acolheram de braços abertos, contribuindo para meu crescimento espiritual e pessoal.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, e que participaram da minha vida durante o período do mestrado. Obrigado por terem feito parte dessa conquista.

*"Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!"*

**Romanos 11:36**



## RESUMO

AMORIM, A. M. T. **Reversão à juvenilidade em *Passiflora edulis* SIMS.** 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

O gênero *Passiflora* é um excelente modelo para estudos de transição de fase, pois há diferenças morfológicas evidentes entre as plantas nas fases juvenil, adulta vegetativa e adulta reprodutiva. Há relatos de que quando se introduzem ápices de plantas adultas de *Passiflora edulis*, quer estejam na fase vegetativa ou reprodutiva, em condições de cultivo *in vitro*, observa-se a regressão à fase juvenil. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as modificações morfológicas envolvidas na reversão à juvenilidade de ápices caulinares adultos de *P. edulis* quando cultivados em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento além de avaliar o efeito de reguladores de crescimento no intuito de evitar a reversão à juvenilidade no cultivo *in vitro* de *P. edulis*. O trabalho foi desenvolvido a partir da combinação da técnica da micropropagação *in vitro* e microscopia eletrônica de varredura, sendo dividido em três experimentos: o cultivo *in vitro* de ápices caulinares em meio MSM sem reguladores de crescimento e análise de amostras em microscópio eletrônico de varredura, cultivo *in vitro* de ápices caulinares em meio MSM com reguladores de crescimento e cultivo *in vitro* de ápices caulinares em meio MSM adicionados com BAP na concentração de 10 $\mu$ M com análises de amostras em microscópio estereoscópico. Através de micrografias eletrônicas e imagens estereoscópicas, foi possível caracterizar as fases do desenvolvimento de *P. edulis*, demonstrando os caracteres morfológicos assim como a manutenção das estruturas cultivadas *in vitro*. Não foi possível observar o rejuvenescimento *in vitro* quando ápices caulinares foram cultivados em meio 1/2 MS ou MSM sem adição de reguladores de crescimento. O rejuvenescimento de ápices caulinares adultos de *P. edulis* foi obtido a partir do cultivo em meio MSM com adição de 10 $\mu$ M de BAP. Entretanto, o rejuvenescimento foi parcial, pois nem todas as características foram revertidas. A formação de folhas lanceoladas *in vitro* e o desenvolvimento de brotos adventícios *in vitro* caracterizaram a reversão à juvenilidade em *P. edulis*. O meio MSM suplementado com 10  $\mu$ M de BAP foi favorável ao desenvolvimento de gemas axilares, além de facilitar a indução do rejuvenescimento dos ápices caulinares. Logo, a reversão à juvenilidade foi alcançada sob as condições *in vitro* adotadas.

Palavras-chave: Maracujá. Rejuvenescimento *in vitro*. Benziloaminopurina (BAP). Ápices caulinares. Folhas lanceoladas. Brotos adventícios.



## ABSTRACT

AMORIM, A. M. T. **Reversion to juvenility in *Passiflora edulis* SIMS**. 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

The genus *Passiflora* is an excellent model for phase transition studies because there are obvious morphological differences between plants in the juvenile, adult vegetative and adult reproductive phases. It has been reported that when introducing shoot tips of adult plants of *Passiflora edulis*, whether in the vegetative or reproductive phase, under *in vitro* culture conditions, regression to the juvenile phase is observed. The general objective of this work was to characterize the morphological changes involved in the reversion to juvenility of adult shoot tips of *P. edulis* when grown in culture medium without addition of growth regulators in addition to evaluating the effect of growth regulators in order to avoid reversion to juvenility in the *in vitro* cultivation of *P. edulis*. The work was developed from the combination of *in vitro* micropropagation and scanning electron microscopy, and was divided in three experiments: *in vitro* culture of shoot tips in MSM medium without growth regulators and analysis of samples in scanning electron microscope; *in vitro* culture of shoot tips in MSM medium with growth regulators and *in vitro* culture of shoot tips in MSM medium added with BAP at the concentration of 10 $\mu$ M and analysis of samples under a stereoscopic microscope. Through electronic micrographs and stereoscopic images, it was possible to characterize the phases of the development of *P. edulis*, demonstrating the morphological traits as well as the maintenance of the structures cultivated *in vitro*. *In vitro* rejuvenation could not be observed when shoot tips were grown in  $\frac{1}{2}$  MS or MSM medium without addition of growth regulators. The rejuvenation of *P. edulis* adult shoot tips was obtained from the cultivation in MSM medium with the addition of 10 $\mu$ M BA. However, the rejuvenation was partial, since not all the characteristics were reversed. The formation of *in vitro* lanceolated leaves and the development of *in vitro* adventitious shoots characterized the reversion to juvenility in *P. edulis*. The MSM medium supplemented with 10 $\mu$ M BA was favorable to the development of axillary buds, in addition to facilitating the induction of the rejuvenation of the shoot tips. Therefore, the reversion to juvenility was achieved under the *in vitro* conditions adopted.

Keywords: Passion fruit. Rejuvenation *in vitro*. Benzyloaminopurine (BAP). Shoot tips. Lanceolated leaves. Adventitious shoots.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
3.1. Gênero <i>Passiflora</i> .....	18
3.2. Heteroblastia .....	19
3.3. Transição de fases em plantas.....	20
3.4. As fases do desenvolvimento em <i>Passiflora edulis</i> .....	22
3.5. Reversão à juvenilidade .....	27
3.6. Regulação hormonal na transição de fases .....	30
3.7. Meristemas.....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. Material Vegetal .....	36
4.2. Cultivo <i>in vitro</i> de ápices caulinares de <i>P. edulis</i> .....	37
4.2.1. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM sem reguladores de crescimento .....	37
4.2.2. Análise de amostras de ápices caulinares cultivadas em meio MSM sem regulador de crescimento com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura .....	40
4.2.3. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com reguladores de crescimento .....	41
4.2.4. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com BAP na concentração de 10 $\mu$ M .....	43
4.2.5. Análise de amostras de ápices caulinares cultivadas em meio MSM com regulador de crescimento com o auxílio de microscópio estereoscópico .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1. Cultivo <i>in vitro</i> de ápices caulinares de <i>P. edulis</i> .....	44
5.1.1. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM sem reguladores de crescimento .....	44

5.1.2. Análise de estádios de desenvolvimento de ápices caulinares cultivadas em meio MSM sem regulador de crescimento.....	45
5.1.3. Caracterização das fases de desenvolvimento de ápices caulinares de <i>Passiflora edulis</i> .....	48
5.1.4. Análise de amostras de ápices caulinares “possivelmente revertidos” cultivados em meio MSM sem regulador de crescimento.....	51
5.1.5. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com reguladores de crescimento .....	53
5.1.6. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com BAP na concentração de 10µM.....	77
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui cerca de 600 espécies de plantas essencialmente tropicais, incluindo *Passiflora edulis*, o maracujazeiro. *P. edulis* é um excelente modelo para estudos de transição de fase, pois há diferenças morfológicas evidentes entre as plantas nas fases juvenil, adulta vegetativa e adulta reprodutiva.

As plantas na fase juvenil não produzem gavinhas; na fase adulta vegetativa, produzem gavinhas nas axilas das folhas e na fase adulta reprodutiva, produzem, a partir dos meristemas axilares, gavinhas e flores. Esse conjunto de características morfológicas distintas encontradas nas diferentes fases do desenvolvimento de *P. edulis* podem ser utilizadas como marcadores para monitorar a progressão das mudanças de fases.

As fases de desenvolvimento da planta são relativamente estáveis, uma vez que não podem ser facilmente revertidas sob condições normais de crescimento ou propagação. No entanto, há relatos de que quando se introduzem ápices de plantas adultas de *P. edulis*, quer estejam na fase vegetativa ou reprodutiva, em condições de cultivo *in vitro*, observa-se a regressão à fase juvenil.

A reversão à juvenilidade ou rejuvenescimento é um processo em que o ápice retoma seu crescimento vegetativo após a produção de estruturas reprodutivas, que deveriam terminar seu desenvolvimento. A reversão à juvenilidade é, portanto, a ocorrência de um retorno a uma fase anterior de desenvolvimento, ocorrendo de forma natural durante a reprodução sexual e a formação de embriões.

Vários métodos artificiais para rejuvenescer plantas maduras foram desenvolvidos, dentre eles, a micropropagação é mais eficiente e amplamente utilizado para o efeito. Estudos indicam que as características relacionadas à maturação podem ser modificadas por meio da cultura *in vitro*.

A maturação é um processo contínuo que resulta em mudanças relativamente estáveis nas fases do desenvolvimento envolvendo diminuição da taxa de crescimento, aumento da frequência de desenvolvimento reprodutivo e características morfológicas alteradas.

A utilização de reguladores de crescimento causa o rejuvenescimento do material vegetal adulto, onde as concentrações internas e aplicações externas dessas substâncias estão relacionadas com características juvenis. Tem sido sugerido que os reguladores de crescimento podem controlar a maturação. Embora

vários reguladores do crescimento tenham demonstrado afetar a juvenilidade, não está claro se as alterações nas suas concentrações controlam diretamente a maturação. A ação hormonal tem sido bastante estudada na transição das fases vegetativa para reprodutiva. No entanto, há uma grande carência na literatura a respeito da ação hormonal na reversão à juvenilidade.

Com o uso de ferramentas apropriadas ao estudo do desenvolvimento, que incluem microscopia eletrônica de varredura e a manipulação das condições hormonais de desenvolvimento, o presente trabalho pretendeu caracterizar morfo-anatomicamente a plasticidade dos meristemas axilares em *Passiflora* durante a reversão de fase induzida pelo cultivo *in vitro*; além de identificar possíveis influências hormonais, mediante a manipulação das concentrações de citocininas, giberelinas e auxinas no meio de cultura. Os resultados obtidos poderão trazer contribuições preciosas para o entendimento da transição de fase em espécies do gênero *Passiflora* com interesse comercial, como o maracujazeiro, bem como a possibilidade de cultivo *in vitro* de plântulas desse gênero nas diferentes fases: juvenil, adulta vegetativa e adulta reprodutiva.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as modificações morfológicas envolvidas na reversão à juvenilidade de ápices caulinares adultos de *Passiflora edulis* quando cultivados em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento além de avaliar o efeito de reguladores de crescimento no intuito de evitar a reversão à juvenilidade no cultivo *in vitro* de *P. edulis*.

Os objetivos específicos compreendem:

I. Caracterizar morfológicamente de maneira detalhada os meristemas axilares e seus produtos, *in vivo* e as modificações observadas durante a reversão à juvenilidade *in vitro* em *Passiflora edulis*.

II. Avaliar o efeito da modulação hormonal, com aplicação exógena, em meio de cultura, de diferentes concentrações dos reguladores vegetais auxina, citocinina e giberelina em *Passiflora edulis*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Gênero *Passiflora*

Os maracujás pertencem à família Passifloraceae, ordem Passiflorales, que compreendem 12 gêneros, com distribuição nos trópicos, principalmente, na América, Ásia e África. No Brasil, a família é representada por apenas dois gêneros: *Dilkea* e *Passiflora* (TEIXEIRA et al., 1994).

O gênero *Passiflora* compreende trepadeiras herbáceas ou lenhosas, podendo apresentar-se como ervas e arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas. Apresentam 5 estames, 5 pétalas, 5 sépalas e um androginóforo ereto formado por estames de extremidades livres e com três estigmas (TEIXEIRA et al., 1994).

Este gênero é constituído por 4 subgêneros constituídos por mais de 500 espécies (HANSEN et al., 2006; MUSCHNER et al., 2012). Dois dos quatro subgêneros são mais numerosos em termos de espécies: o subgênero *Passiflora* inclui 236 espécies e o subgênero *Decaloba* compreende 214 espécies. Por outro lado, os subgêneros *Astrophaea* e *Deidamiodes* possuem 57 e 13 espécies, respectivamente (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O subgênero *Passiflora* apresenta 50 a 60 espécies de frutos comestíveis, em que somente alguns têm valor comercial (MARTIN; NAKASONE, 1970), tendo como destaque a espécie *Passiflora edulis* Sims.

A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional, sendo que a evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial (REETZ, 2015). Dentre as espécies cultivadas comercialmente no Brasil, o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), é o responsável por 95% dos pomares, devido à excelente qualidade e rendimento de suco, e também pelo vigor, produtividade, e as condições ecológicas para seu cultivo no país (BERNACCI et al., 2008; MELETTI; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2010).

Segundo Almeida Lima e Cunha (2004), *P. edulis* é uma trepadeira perene semi-lenhosa que produz grandes flores atraentes, com sistema radicular axial ou pivotante (60% das raízes a 30 cm de profundidade), caules cilíndricos ou angulados, semi-flexíveis e trepadores, providos de gavinhas solitárias nas axilas das folhas que servem de suporte, folhas alternas, inteiras ou lobadas, flores hermafroditas, actinomorfas, isoladas ou aos pares nas folhas. A flor é auto-incompatível, dependendo da polinização cruzada para fecundação, uma vez, que o pólen não é transportado pelo vento devido sua grande massa e elevada viscosidade, necessitando de agentes polinizadores, as mamangavas. O fruto tem forma ovóide ou globosa, com polpa mucilagínosa, com sementes epigeas.

Entre as espécies do gênero *Passiflora* observa-se uma grande diversidade de morfologia e inovações evolutivas como as gavinhas, a corona e o androginóforo, estes dois últimos, presentes na flor. Acredita-se que estas estruturas sejam produto de plasticidade adaptativa, modulada pela evolução (AIZZA; DORNELAS, 2011; ULMER; MACDOUGAL, 2004). O gênero é um excelente modelo para estudos de transição de fase, pois há diferenças morfológicas evidentes entre as plantas nas fases juvenil, adulta vegetativa e adulta reprodutiva.

### **3.2. Heteroblastia**

As diferenças anatômicas e morfológicas nos órgãos de plantas produzidos nos estágios de desenvolvimento anteriores (juvenis) e posteriores (adultos), podem ser frequentemente usadas como marcadores para monitorar a progressão da mudança de fases. Esse fenômeno é denominado heteroblastia e é observado em muitas espécies (HUIJSER; SCHMID, 2011).

O termo "heteroblástico" foi inicialmente introduzido por Goebel para descrever uma forma de desenvolvimento de plantas, onde diferenças substanciais entre as fases anteriores e posteriores podem ser observadas em oposição ao tipo de desenvolvimento "homoblástico" caracterizado por mudanças pequenas e graduais. Essas mudanças podem afetar o broto inteiro assim como sua fisiologia (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011).

A heteroblastia é frequentemente empregada para descrever mudanças no corpo vegetativo, como na forma, tamanho e propriedades anatômicas das folhas,

filotaxia, potencial e destino de brotos axilares, capacidade de enraizamento (JONES, 1999).

Além das mudanças graduais nas características vegetativas, ocorrem mudanças progressivas ontogenéticas graduais nos traços fenotípicos associadas a mudanças de tamanho, bem como uma mudança de fase juvenil para adulta associada ao amadurecimento e possíveis alterações fisiológicas funcionais dos órgãos vegetativos (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011).

A heteroblastia está associada a mudanças sequenciais entre os fitômeros que ocorrem como uma expressão normal da ontogenia da planta inteira, e também inclui todas as mudanças envolvidas na transição para a reprodução. Como resultado, diferentes partes de uma planta podem existir em diferentes fases de desenvolvimento (JONES, 1999).

Os exemplos clássicos de desenvolvimento heteroblástico são encontrados entre as espécies do gênero *Acacia*, hera inglesa (*Hedera helix*), videiras aróides e *Ulex europeus* (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011). Em muitas espécies, observam-se alterações morfológicas e estruturais especificamente em folhas, entretanto, a heteroblastia não se limita às folhas, embora seja certo que muitos estudos sobre heteroblastia se concentram nas diferenças na forma e tamanho das folhas. Diferenças também podem ser encontradas em filotaxia, comprimento de entrenó, pigmentação de antocianina, capacidade de enraizamento ou estrutura da madeira (FRYDMAN; WAREING, 1973; RUMBALL, 1963).

### **3.3. Transição de fases em plantas**

A transição entre as fases de desenvolvimento nas plantas é reconhecida como mudança de fase e é dependente de programas genéticos de desenvolvimento que são desencadeados e modulados por estímulos ambientais e endógenos. Essas transições entre as fases são rigorosamente reguladas ao longo do desenvolvimento, uma vez que as plantas devem integrar a informação do ambiente, bem como os sinais endógenos, para maximizar seu sucesso reprodutivo (HUIJSER; SCHMID, 2011).

O ciclo de vida de plantas que desenvolvem flores pode ser considerado como uma sucessão de fases distintas de crescimento. Enquanto as plantas tornam-

se competentes para florescer e se reproduzir, a parte aérea da maioria das espécies passa por uma fase de crescimento vegetativo. Durante este período, as plantas geralmente aumentam rapidamente sua capacidade fotossintética, seu tamanho e massa (HUIJSER; SCHMID, 2011). Esta etapa do crescimento vegetativo pode ainda ser dividida em uma fase juvenil e uma fase adulta-vegetativa.

Poethig (1990) afirma que as mudanças de fase ocorrem em meristemas baseados em sua associação com um estágio particular do desenvolvimento. Segundo Singer e McDaniel (1986), existe um gradiente no comportamento potencial, ou determinação, dos meristemas dentro de um organismo que pode diferir acentuadamente em plantas de diferentes estágios.

Segundo Zimmerman, Hackett e Pharis (1985), as fases de desenvolvimento da planta são relativamente estáveis, uma vez que não podem ser facilmente revertidas sob condições normais de crescimento ou propagação. São geralmente associadas a conjuntos de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que mudam de forma coordenada e, portanto, são relativamente discretos, em que os traços que caracterizam uma fase são geralmente substituídos por aqueles que caracterizam o próximo (KERSTETTER; POETHIG, 1998).

A fase juvenil também pode estar associada a conjuntos de características vegetativas específicas do táxon que diferem daqueles na fase reprodutiva, tais como diferenças na forma e tamanho da folha, filotaxia, retenção de folhas, eficiência fotossintética, resistência a doenças e insetos, ou características epidérmicas (POETHIG, 1990; WAREING, 1959). Em plantas lenhosas, as definições da fase juvenil geralmente também incluem o seguinte: as estacas da planta têm a capacidade de produzir raízes (ALLSOPP, 1967; WAREING, 1959; ZIMMERMAN; HACKETT; PHARIS, 1985). Uma definição desta fase para plantas herbáceas e lenhosas é uma incapacidade de florescer, mesmo em condições indutivas (KERSTETTER; POETHIG, 1998; POETHIG, 1990; ZIMMERMAN; HACKETT; PHARIS, 1985).

Quase todas as plantas apresentam alterações no tamanho final da folha ou nas dimensões relativas do pecíolo e da lâmina das primeiras folhas de mudas para as mais recentes, independentemente do meio ambiente, em que muitas espécies podem exibir mudanças marcantes e qualitativas entre formas de folhas juvenis e adultas (por exemplo, simples a lobadas ou vice-versa) (JONES, 1999).

Durante a transição de fase juvenil para adulta, as plantas adquirem competência reprodutiva. Em *Arabidopsis*, o aparecimento de tricomas na face abaxial das folhas caracteriza morfologicamente a transição da fase juvenil para a adulta (TELFER; BOLLMAN; POETHIG, 1997). A hera inglesa (*Hedera helix*) tem sido usada historicamente como planta de pesquisa modelo para estudar a mudança de fase por causa de suas formas de crescimento distintas em cada fase. A fase juvenil é uma videira com uma folha lobulada. Em sua fase adulta, produz uma haste vertical que termina em uma inflorescência, com suas folhas inteiras. *Passiflora caerulea* apresenta folhas inteiras em sua fase juvenil e posteriormente, folhas heptalobadas quando atinge sua forma adulta (TRIPPI, 1990).

A transição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo é marcada pela produção de uma estrutura completamente nova e especializada para a produção de gametas (por exemplo, uma flor ou cone) (HUIJSER; SCHMID, 2011). A fase adulta pode ser distinguida pela reprodução sexual, mas também pode ser associada a diferenças nos fitômeros vegetativos, incluindo diferentes formas de folhas, filotaxia, traços epidérmicos, etc.

Há um pequeno desentendimento de que a capacidade de reprodução é um sinal claro da fase adulta. No entanto, detectar a capacidade de florescer antes da formação de estruturas reprodutivas nem sempre é direto. Em algumas espécies (por exemplo, hera inglesa e milho, ambos exemplos clássicos de mudança de fase), a aquisição de competência para o florescimento está intimamente associada a uma mudança das características vegetativas juvenis para adultas, onde os traços vegetativos adultos são os que estão em vigor quando a floração ocorre (JONES, 1999; POETHIG, 1990).

A aquisição de características vegetativas adultas é considerada como indicador, definindo que a planta já entrou na fase adulta e, portanto, é competente para florescer. Nesta fase, o potencial reprodutivo é estabelecido (KERSTETTER; POETHIG, 1998).

### **3.4. As fases do desenvolvimento em *Passiflora edulis***

As espécies de *Passiflora* apresentam um claro período juvenil. Em *P. edulis*, pertencente ao subgênero *Passiflora*, as folhas juvenis são lanceoladas, enquanto

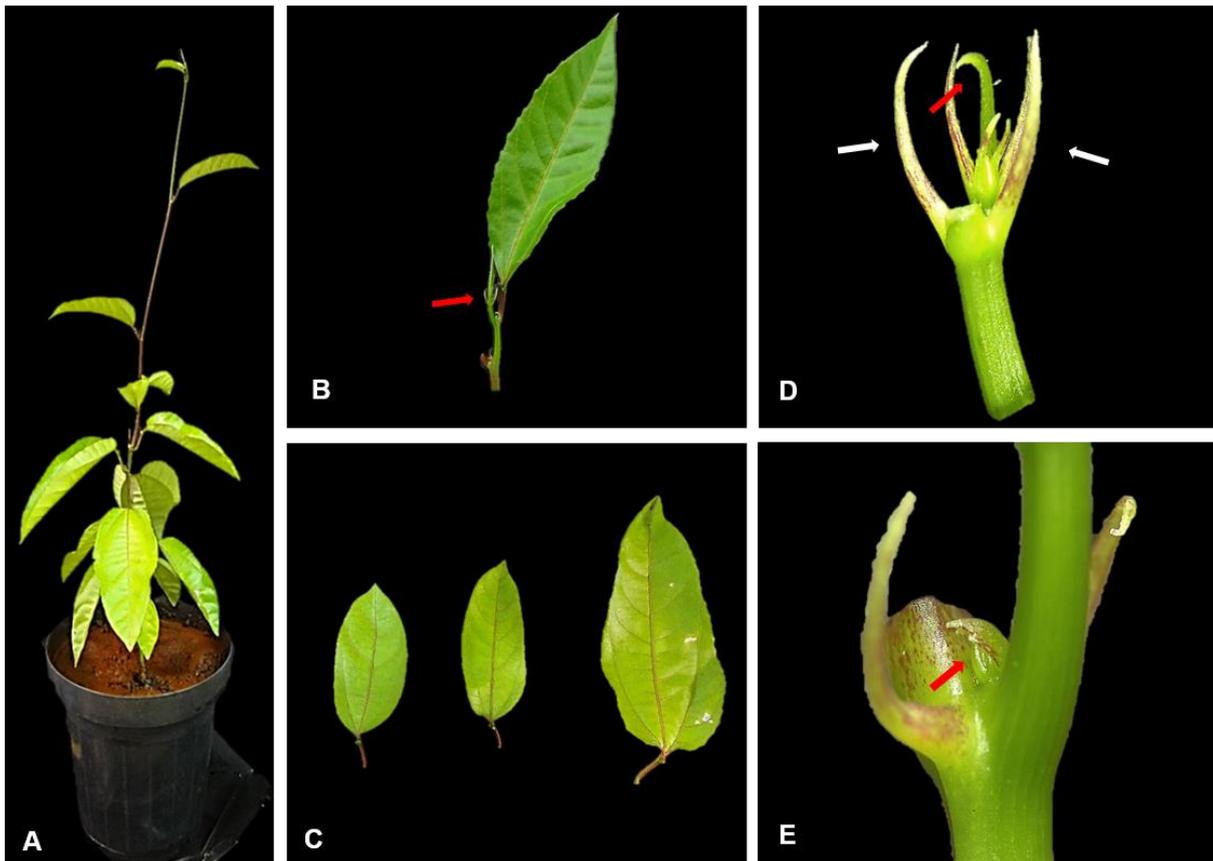
as não-juvenis são trilobadas (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Adicionalmente, após a passagem do período juvenil, um meristema capaz de formar tanto gavinhas quanto flores, é formado na axila das folhas (CUTRI et al., 2013; NAVE et al., 2010).

Desta forma, quando os botões florais se desenvolvem, estes são formados lado a lado com as gavinhas (CUTRI et al., 2013; NAVE et al., 2010; ULMER; MACDOUGAL, 2004). As espécies de *Passiflora* originaram-se em ecossistemas onde há densa vegetação e competição por luz. Assim, a presença de estruturas como gavinhas, que permite a escalada em outras plantas para ter acesso à luz, é considerada uma vantagem adaptativa (CUTRI et al., 2013).

Gavinhas são encontradas em espécies de diferentes grupos vegetais. Em legumes, como ervilha, as gavinhas são consideradas folhas modificadas, produzidas pelo meristema vegetativo; no entanto, em videira, as gavinhas são formadas por meristemas axilares, que podem produzir tanto gavinhas quanto inflorescências (CALONJE et al., 2004; GOURLAY; HOFER; ELLIS, 2000). No gênero *Passiflora*, por outro lado, o mesmo meristema produz simultaneamente uma gavinha e uma ou mais flores (AKAMINE; GIROLAMI, 1959; CUTRI et al., 2013; KROSNICK; FREUDENSTEIN, 2005; NAVE et al., 2010).

Em *P. edulis*, durante a fase juvenil, os fitômeros são caracterizados pela presença de folhas lanceoladas, estípulas (folhas acessórias), e gemas axilares, as quais são as únicas a serem formadas nas axilas das folhas (Figura 1). As primeiras folhas são lobadas ou lanceoladas, e ovais, com ápice acuminado e nervura palmada. O pecíolo apresenta em sua extremidade, um par de glândulas (os nectários extraflorais) e em sua porção basal, um par de estípulas. O período da fase juvenil é de aproximadamente 80 dias desde a semeadura. (CAÑIZARES CHACÍN; JARAMILLO AGUILAR, 2015).

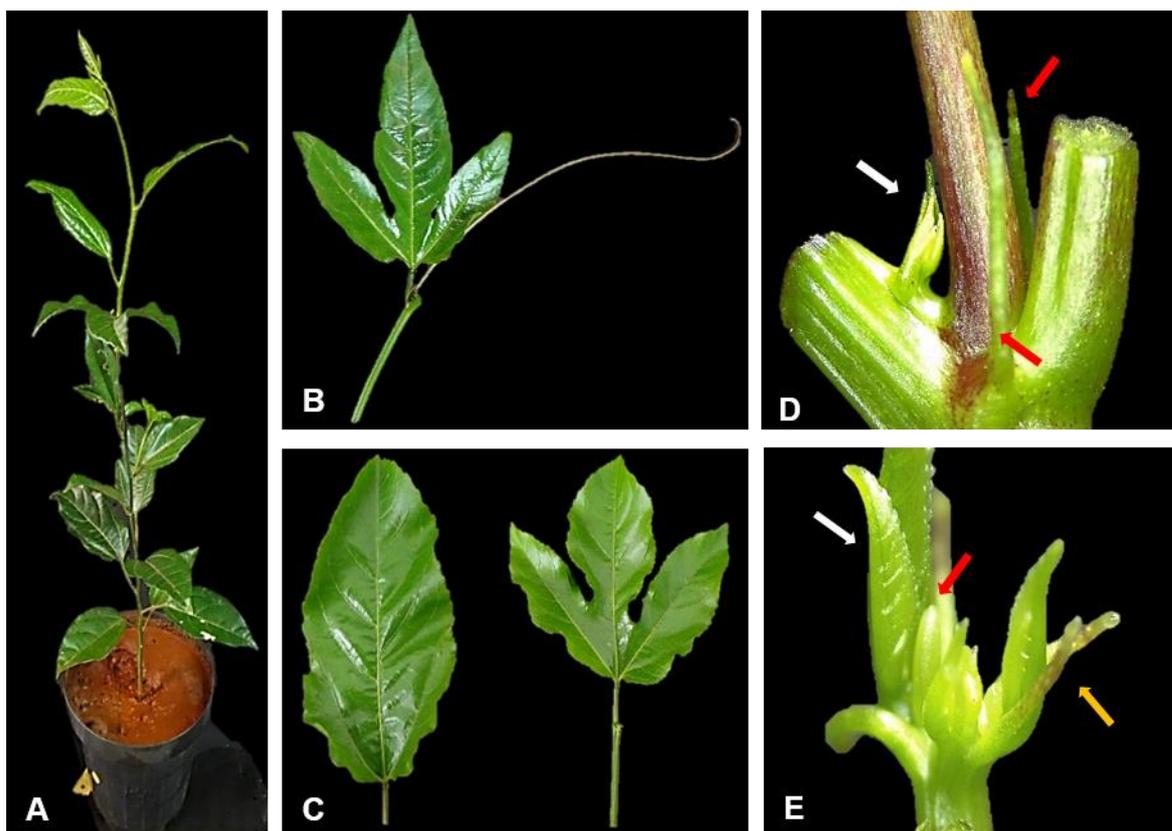
Figura 1 - Características estruturais e morfológicas de uma planta juvenil de *Passiflora edulis*. A. Planta em desenvolvimento na fase juvenil; B. Fitômero de uma planta juvenil; sendo constituído por um folha lanceolada, uma gema axilar, estípulas e um ápice caulinar; C. Folhas lanceoladas; D. Ápice caulinar em destaque, presença de um par de folhas acessórias – estípulas – (setas brancas), folha lanceolada (seta vermelha) e ausência de gavinhas; E. Gema localizada na axila da folha (seta vermelha).



Durante a transição para fase adulta, observa-se uma série de mudanças no comprimento internodal, na forma da folha e crescimento inicial das gavinhas, expressões morfológicas e fisiológicas que caracterizam esta fase (CAÑIZARES CHACÍN; JARAMILLO AGUILAR, 2015). As gavinhas são produzidas por um meristema axilar, e as gemas axilares localizam-se adaxialmente às gavinhas. Ocorre também o desenvolvimento das folhas, que durante a transição, apresentam alterações morfológicas. Neste processo, aparecem as folhas trilobadas, embora, ocasionalmente, se observem algumas folhas bilobadas.

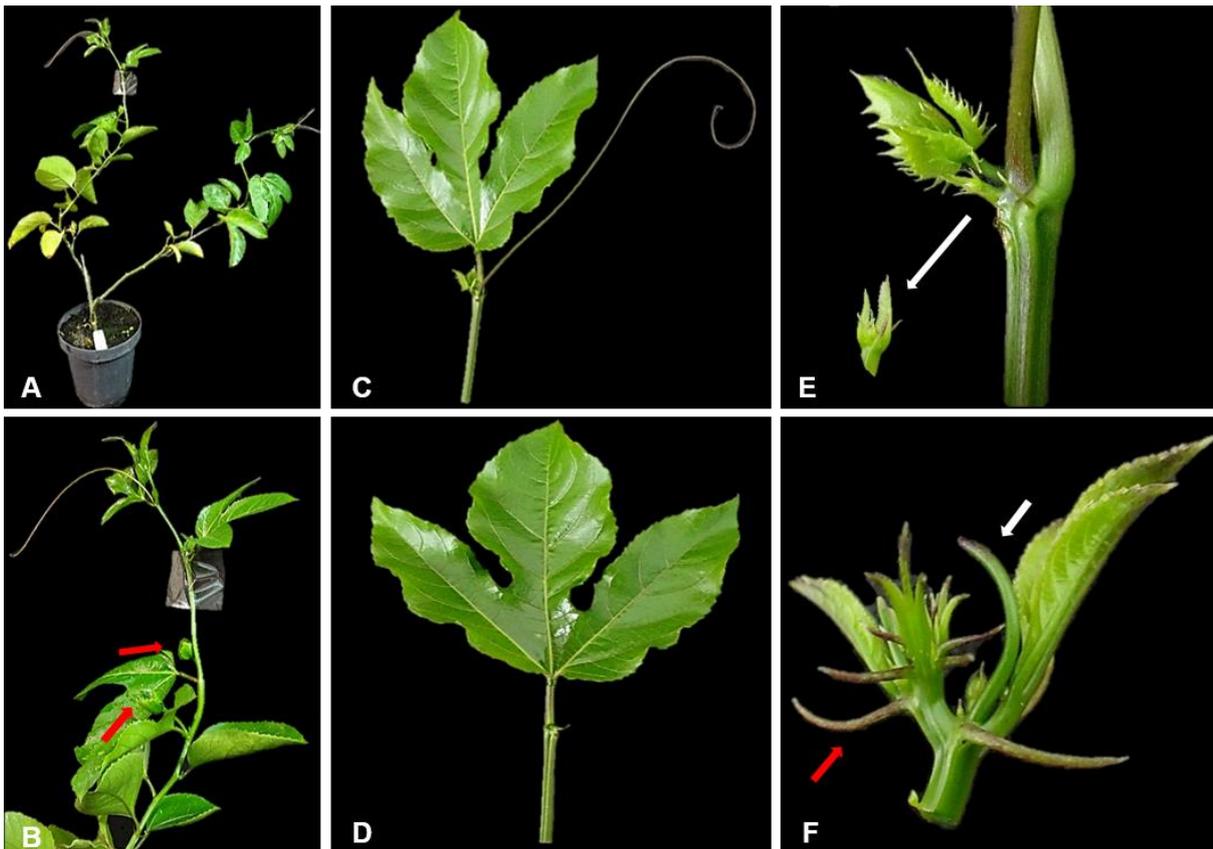
Durante a fase adulta, que pode ser dividida em adulta vegetativa e adulta reprodutiva, ocorre a formação de novas estruturas, o que caracteriza a distinção entre as duas etapas da fase adulta. Na fase adulta vegetativa, os fitômeros são caracterizados pela presença de folhas trilobadas, gavinhas, estípulas, gemas axilares (Figura 2).

Figura 2 - Características estruturais e morfológicas de uma planta na fase adulta-vegetativa de *Passiflora edulis*. A. Planta em desenvolvimento na fase adulta-vegetativa; B. Fitômero de uma planta na fase adulta-vegetativa, sendo constituído por uma folha trilobada, uma gavinha, um par de estípulas e uma gema axilar; C. Ao lado esquerdo, uma folha trilobada, e ao lado direito, uma folha lanceolada, ambas presentes durante a fase adulta-vegetativa; D. Gema axilar localizada adaxialmente à gavinha (seta branca); par de estípulas flanqueando a gavinha (setas vermelhas); E. Ápice caulinar com folhas trilobadas (seta branca), gavinhas (seta vermelha) e estípulas (seta amarela).



Na fase adulta reprodutiva, os fitômeros são caracterizados pela presença de folhas trilobadas, gavinhas, estípulas, que flanqueiam as folhas, além de gemas axilares e botões florais formados por três brácteas (Figura 3). A flor emerge à direita da base da gavinha. Observa-se uma intensa ramificação quando se inicia a floração (CAÑIZARES CHACÍN; JARAMILLO AGUILAR, 2015).

Figura 3 - Características estruturais e morfológicas de uma planta na fase adulta-reprodutiva de *Passiflora edulis*. A. Planta em desenvolvimento na fase adulta-reprodutiva; B. Ramo de uma planta na fase adulta-reprodutiva com botões florais (setas vermelhas); C. Fitômero de uma planta na fase adulta-reprodutiva; sendo constituído por um folha trilobada, um par de estípulas, uma gavinha, um botão floral e uma gema vegetativa; D. Folha trilobada; E. Nó apresentando um botão floral, um par de estípulas, uma gema vegetativa e gavinha. Na margem inferior esquerda, a gema axilar convertida em um novo ápice caulinar (seta branca); F. Ápice caulinar em detalhe, presença de folhas trilobadas, folhas acessórias – estípulas – (seta vermelha) e gavinhas (seta branca).



### 3.5. Reversão à juvenilidade

A mudança do crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo envolve uma importante transição no desenvolvimento do ápice vegetativo. Esta transição pode ocorrer uma vez, em espécies anuais, ou repetidamente, em plantas perenes. As plantas passam por fases sucessivas de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo em que órgãos são formados na parte aérea. Estes órgãos são derivados do meristema apical caulinar (MAC), um grupo de células indiferenciadas presentes no ápice da planta. Durante o desenvolvimento vegetativo, o MAC origina órgãos vegetativos, como folhas ou brotos vegetativos. Sob tempo determinado pelas condições ambientais e pelo genótipo da planta individual, ocorre transição para o desenvolvimento reprodutivo (ALBANI; COUPLAND, 2010).

Segundo Zimmerman, Hackett e Pharis (1985), as fases de desenvolvimento das plantas são relativamente estáveis, uma vez que não podem ser facilmente revertidas sob condições normais de crescimento ou propagação.

A reversão à juvenilidade ou rejuvenescimento é um processo em que o ápice retoma seu crescimento vegetativo após a produção de estruturas reprodutivas, que deveriam terminar seu desenvolvimento. A reversão à juvenilidade é, portanto, a ocorrência de um retorno a uma fase anterior de desenvolvimento (TOOKE et al., 2005). O estado de desenvolvimento do ápice é essencial para a ocorrência do processo de reversão. Enquanto o meristema não estiver completamente comprometido com a formação de flores ou inflorescências, o crescimento vegetativo pode ser reiniciado (GOLA et al., 2015).

O rejuvenescimento refere-se à reversão da maturação durante a reprodução sexual e a formação de embriões, ou pelo uso de tratamentos culturais como poda, micropropagação e enxerto em série, ou a aplicação de inibidores do crescimento de plantas (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014). A maturação é um processo contínuo que resulta em mudanças de desenvolvimento relativamente estáveis envolvendo diminuição da taxa de crescimento, aumento da frequência de desenvolvimento reprodutivo e características morfológicas alteradas que são mantidas mesmo sob condições fisiológicas melhoradas (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014).

Várias técnicas foram desenvolvidas para revigorar, rejuvenescer ou manter a juvenildade das plantas. Nenhuma dessas técnicas é tão eficaz quanto o rejuvenescimento natural, em que as partes mais maduras da planta, os órgãos reprodutivos, produzem as partes mais juvenis das plantas, os embriões, através da gametogênese e da reprodução sexual. Os critérios mais comuns para identificar o rejuvenescimento são baseados na morfologia, na capacidade morfogênica e na capacidade de produzir cones ou flores (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014).

Muitos autores relatam que o rejuvenescimento é mais proeminente em árvores, embora ocorra também em outras espécies lenhosas de diferentes portes e em espécies herbáceas.

Em *Impatiens balsamina*, espécie de dia curto, as plantas derivadas de sementes, cultivadas em condições não-indutivas ao florescimento, foram revertidas através de experimentos fotoperiódicos, quando induzidas ao florescimento em condições de dias curtos (por 5 dias). Foram novamente transferidas para condições não-indutivas de florescimento, em dias longos, por 9 dias. As plantas apresentaram a formação de folhas no lugar de pétalas. Contudo, as plantas revertidas formaram novas flores através da transferência para dias curtos (condições indutivas ao florescimento) após 9 dias longos (BATTEY; LYNDON, 1986).

Em *Lycopodium annotinum*, os estróbilos, que são as estruturas reprodutivas, responsáveis pela formação e desenvolvimento de esporos, também sofreram rejuvenescimento. O surgimento dos estróbilos revertidos ocorreu tipicamente no inverno, enquanto que durante o verão, os estróbilos foram formados tipicamente. Assim, seu desenvolvimento pode ser ambientalmente regulado, por exemplo, pelo fotoperíodo e/ou temperatura e prejudicado quando as condições não são ótimas para a esporulação (GOLA et al., 2015).

O rejuvenescimento pode ser obtido através de subcultivos sucessivos *in vitro* de brotações, especialmente em meios contendo citocininas (BONGA; ADERKAS, 1992; VON ADERKAS; BONGA, 2000). Ápices caulinares de árvores de *Larix decidua* de 140 anos de idade produzem raízes adventícias após dez subcultivos sucessivos, mas maior enraizamento e sobrevivência de plantas ocorre após 14 subcultivos quando as agulhas manifestam morfologia juvenil (KRETZSCHMAR; EWALD, 1994 apud WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014).

Na maioria das espécies lenhosas, em porte de árvores, o enraizamento obtido através de uma combinação de técnicas culturais, é facilitado ou favorecido pelo rejuvenescimento. A competência de enraizamento geralmente diminui com a maturação de uma planta, o que corresponde à diminuição da juvenilidade. Logo, a facilidade de enraizamento é característica de plantas ou órgãos em fase juvenil, enquanto o enraizamento é menos favorecido em plantas perenes lenhosas em fase adulta.

A reversão é considerada resultante de uma falta de determinação no destino do desenvolvimento do meristema. A determinação pode ser testada através de experimentos envolvendo a propagação da planta, botão, meristema ou célula em questão, longe de condições (ou fontes de sinal) que induzem inflorescência ou destino floral (HUALA; SUSSEX, 1993).

A competência pode ser definida como o estado de uma célula na qual é capaz de responder a sinais extracelulares. A determinação torna-se então o estado de uma célula previamente competente que respondeu ao sinal externo, comprometendo-o com um caminho de diferenciação que incluirá a organogênese. Se as células de um explante ainda não são competentes no momento da excisão, elas podem ser induzidas a se tornarem *in vitro* (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a). O comprometimento das células é geralmente modificado através de alterações no ambiente *in vitro*, particularmente pela alteração da disponibilidade de reguladores de crescimento de plantas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a).

Vários processos para rejuvenescer plantas maduras foram desenvolvidos, a micropropagação é o método mais eficiente e amplamente utilizada para o efeito. Estudos indicam que as características relacionadas à maturação podem ser modificadas por meio da cultura *in vitro* (BONGA; ADERKAS, 1992; HACKETT; MURRAY, 1993).

Em *Vaccinium cylindraceum* Smith, um eficiente método *in vitro* foi desenvolvido para propagar brotos de arbustos silvestres maduros por meio da proliferação de gemas axilares em brotações epicórmicas. Através da cultura de brotações epicórmicas foram produzidos novos brotos com características morfológicas juvenis (PEREIRA, 2009).

Plantas de mirtilo micropropagadas na presença de citocinina e submetidas a sucessivas repicagens, demonstram elevada habilidade de rejuvenescimento *in vitro* do material adulto, podendo ser comparadas às plantas obtidas de semente, tanto

na capacidade de emitir novas brotações, quanto no número de gemas e taxa de multiplicação (SCHUCH et al., 2008).

A cultura *in vitro* é de fundamental importância, haja vista a possibilidade da manutenção e do monitoramento do desenvolvimento de meristemas, uma vez que, o isolamento dos meristemas em ápices caulinares retirados das plantas em campo e introduzidos em meios de cultura, permite, certo controle sobre as condições de crescimento dos mesmos, como por exemplo, na formação e número de folhas, na relação do tipo /nível de reguladores de crescimento e fontes de nutrientes (TOOKE et al., 2005). Logo, é dada a importância do meio de cultura e de outras condições de cultivo no que diz respeito ao rejuvenescimento *in vitro* (HACKETT, 1985).

### **3.6. Regulação hormonal na transição de fases**

Os avanços na compreensão da regulação das transições das fases de desenvolvimento são oriundos dos estudos realizados sobre a transição das fases vegetativa para reprodutiva em espécies modelo (HUIJSER; SCHMID, 2011). A transição entre estas fases é dependente de programas genéticos de desenvolvimento que são desencadeados e modulados por estímulos ambientais e endógenos, como os hormônios vegetais.

Os hormônios vegetais ou fitormônios são compostos endógenos que regulam múltiplos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas a baixas concentrações. O grau de resposta é regulado pela concentração do hormônio. Assim como os hormônios vegetais, os reguladores de crescimento, que são substâncias sintetizadas quimicamente, provocam reações similares às aquelas causados pelos naturais (DAVIES, 2004).

São importantes tanto na transição da fase juvenil para adulta, como na transição da fases vegetativa para a reprodutiva. Esforços realizados para identificar os fatores endógenos que regulam a mudança de fase vegetativa concentraram-se em carboidratos e ácido giberélico (GA). Dependendo da espécie, o GA promove ou suprime a mudança entre a fase vegetativa e a fase reprodutiva (ZIMMERMAN; HACKETT; PHARIS, 1985).

O ácido giberélico parece ser o principal regulador das mudanças de fase, no desenvolvimento reprodutivo. As giberelinas estão envolvidas na iniciação floral, no comprimento de entrenós, na germinação de sementes, no alongamento da parte aérea e na estimulação da produção precoce de flores nas gimnospermas, sendo produzido nas raízes e nos frutos de plantas superiores, além dos precursores de AG produzidos em folhas e gemas, que são convertidos em outras formas nas raízes (MEILAN, 1997; PHARIS; WEBBER; ROSS, 1987; PLUMMER et al., 1989). Quando aplicados exogenamente, algumas giberelinas inibem a floração em diversas espécies lenhosas (OLIVEIRA; BROWNING, 1993; ZIMMERMAN; HACKETT; PHARIS, 1985).

A aplicação de GA exógeno, por exemplo, promove o rejuvenescimento em *Hedera helix* (ROGLER; HACKETT, 1975), *Acacia melanoxylon* (BORCHERT, 1965), *Hedera canariensis* (GOODIN; STOUTEMYER, 1961), Citrus (COOPER; PEYNADO, 1958), pêra (GRIGGS; IWAKIRI, 1961), *Cocos nucifera* (SCHWABE, 1976), *Morus nigra* (TRIPPI, 1963) e várias espécies de *Prunus* (CRANE; PRIMER; CAMPBELL, 1960), mas acelera o florescimento em milho (EVANS; POETHIG, 1995) e *Arabidopsis* (TELFER; BOLLMAN; POETHIG, 1997).

Os hormônios auxina (DE ZEEUW; LEOPOLD, 1955) e citocinina (MULLINS; NAIR; SAMPET, 1979) também parecem estar envolvidos na transição entre as fases juvenil e adulta. As auxinas estimulam a diferenciação do tecido vascular, aumentando assim o fornecimento de nutrientes e hormônios aos órgãos em desenvolvimento e acelerando seu desenvolvimento (BRUINSMA, 1973). Poethig (1990) afirmou que os níveis de ácido indol-3-acético (AIA) e citocinina influenciam diretamente a presença de atividade mitótica no meristema, responsável pela estabilidade genética das fases juvenil e adulta.

As auxinas controlam processos básicos, como a divisão celular e o alongamento celular. Estão envolvidas na formação de meristemas que dão origem a um tecido não organizado ou a órgãos definidos. Em tecidos organizados, as auxinas estão envolvidas no estabelecimento e manutenção da polaridade e, em plantas inteiras, seu efeito mais marcante é a manutenção da dominância apical e a mediação de tropismos (FRIML, 2003).

Participam ativamente na regulação de vários processos de crescimento e formação nas plantas. Estão envolvidas em processos de regeneração ativa que ocorrem em uma planta, como restauração de órgãos ausentes, iniciação de gemas vegetativas, reprodução de células calosas (KEFELI; KALEVITCH, 2003). Na micropropagação, as auxinas são utilizadas para induzir calos e, combinadas com as citocininas, promovem o crescimento de calos, suspensões celulares e, em altas concentrações relativas às citocininas, promovem as raízes (BEYL, 2011).

As citocininas promovem a divisão celular na parte aérea e regulam positivamente o tamanho e a atividade do meristema apical caulinar (BARTON, 2010). Desempenham um papel em uma variedade de processos, incluindo divisão e diferenciação celular, atraso da senescência, desenvolvimento de cloroplastos, captação e alocação de recursos, nodulação em espécies leguminosas, desenvolvimento vascular, bem como iniciação e desenvolvimento de brotos. Em sistemas de cultura de tecidos, eles são usados para superar a dormência apical, permitindo proliferação de brotos, e estimular a divisão celular, muitas vezes em conjunto com as auxinas (BEYL, 2011).

Os inibidores de crescimento também têm certa influência durante as transições de fases em plantas. O Paclobutrazol (PBZ), atua na inibição da biossíntese de giberelina, promovendo não apenas mudanças morfológicas no crescimento das plantas, mas também maximizando a taxa de brotação (ROBERTS et al., 1992; SMITH et al., 1992; SMITH; ROBERTS; MOTTLEY, 1990). Os inibidores da biossíntese de GA reduzem o alongamento vegetativo e aumentam a formação de flores em várias espécies diferentes (BUBAN; FAUST, 1982; GOLDSCHMIDT; MONSELISE, 1972; KATZ et al., 2003; LUCKWILL; SILVA, 1979; MEILAN, 1997).

Assim como o Paclobutrazol, o ácido naftil-ftalâmico (NPA) interfere num processo crucial do crescimento e desenvolvimento das plantas. O transporte polar da auxina é necessário para direcionar os fluxos de auxina e formar gradientes de nas plantas, que são críticos para a formação de padrões (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b). O NPA favorece a inibição do transporte polar de auxina, tendo a capacidade de promover ou modificar a morfogênese e, em muitos casos, parece ter suprimido o efeito da auxina exógena ou endógena (MOSHKOV et al., 2008). Em milho, a aplicação de NPA previne o início de meristemas axilares nas inflorescências e afeta o desenvolvimento de espiguetas (WU; MCSTEEN, 2007).

Os hormônios e reguladores de crescimento de plantas têm efeitos pleiotrópicos, estando envolvidos no controle de uma ampla gama de processos de desenvolvimento. Ao mesmo tempo, o efeito de um hormônio em qualquer processo de desenvolvimento depende da espécie (STADEN; ZAZIMALOVA; GEORGE, 2008).

Tem sido sugerido que os reguladores de crescimento podem controlar a maturação. Embora vários reguladores do crescimento tenham demonstrado afetar a juvenilidade, não está claro se as alterações nas suas concentrações controlam diretamente a maturação. Sua ação pode ser indireta, por exemplo, afetando a partição ou mobilização de assimilados (SGAMMA, 2017). Segundo Andreu e Marin (2005), a utilização de reguladores de crescimento causa o rejuvenescimento do material vegetal adulto, onde as concentrações internas e aplicações externas dessas substâncias estão relacionadas com características juvenis (SCHUCH et al., 2008). Ballester et al. (1990) afirmam que tratamentos específicos com hormônios vegetais podem alcançar a reversão da fase adulta para a fase juvenil.

Desta forma, há evidências de que, semelhante ao que ocorre com os sinais de fotoperíodo e temperatura, os sinais hormonais também possuem efeito espécie-dependente e sua ação tanto na transição das fases juvenil para adulta ou vegetativa para reprodutiva têm sido bastante estudadas (HUIJSER; SCHMID, 2011). No entanto, há uma grande carência na literatura a respeito da ação hormonal na reversão à juvenilidade (POETHIG, 2010).

### **3.7. Meristemas**

Como as plantas mantêm os meristemas apicais para manter a capacidade de organogênese durante o desenvolvimento pós-embriônico, muitos meristemas são favorecidos (TIAN; JIAO, 2015). Segundo Albani e Coupland (2010), a maioria das espécies, tem seu desenvolvimento vegetativo mantido pelos meristemas axilares. Os meristemas axilares são iniciados nas axilas das folhas, a partir do limite entre o meristema apical caulinar e os primórdios foliares. Este limite é uma faixa estreita com um pequeno número de células. Nas axilas das folhas, a proliferação

celular é posteriormente evocada para se tornarem novas células meristemáticas (WANG et al., 2014).

A arquitetura da planta é formada por séries de módulos similares produzidos pelos meristemas. Esses módulos, denominados fitômeros, consistem em um segmento de caule (entrenó) e um nó, que contém uma ou mais folhas ou estruturas foliares e um ou mais meristemas axilares associados à axila de cada folha (MCSTEEN; LEYSER, 2005). Possuem o mesmo potencial de desenvolvimento do MAC, uma vez que cada um deles pode formar uma ramificação caulinar completa ou inflorescências durante o desenvolvimento reprodutivo. Sendo assim, os meristemas axilares são os principais elementos na determinação da arquitetura e do sucesso reprodutivo das plantas (RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

De acordo com Rodrigues e Kerbauy (2009), a flexibilidade encontrada na atividade dos meristemas axilares permite uma variação considerável na arquitetura da planta, proporcionando adaptações à sua forma de acordo com as condições ambientais situadas. O desenvolvimento das gemas formadas pelos meristemas axilares é regulado por vários sinais ambientais e endógenos. Entretanto, os mecanismos sinalizadores mais finos envolvidos no controle deste processo são pouco compreendidos. Dentre as moléculas conhecidas como importantes mediadoras na transdução de sinais ambientais que regulam a atividade meristemática, os fitormônios, destacam-se as citocininas e auxinas.

As alterações mais sutis na natureza e destino dos meristemas axilares ocorrem durante a transição geral de estágios juvenis para adultos da planta. Os meristemas axilares são formados em estágios específicos de desenvolvimento, ou podem variar em tamanho ou potencial de crescimento dependendo do estágio em que são formados (BENNETT; LEYSER, 2006).

A maioria das gemas axilares crescerá para formar ramos laterais, que geralmente repetem o padrão de desenvolvimento observado no broto primário, incluindo a produção de folhas, flores, meristemas axilares, eventualmente, ramos laterais. No entanto, alguns meristemas axilares podem formar estruturas diferentes, dependendo das espécies e condições (BENNETT; LEYSER, 2006).

Em *P. edulis*, os meristemas laterais são estruturas únicas derivadas do meristema apical caulinar e podem desenvolver uma flor ou uma gavinha, caracterizando um alto grau de plasticidade na produção e ativação dos meristemas axilares nesta espécie. A natureza e as propriedades dos meristemas axilares são alteradas com as mudanças de fase que as plantas passam por meio de seu ciclo de vida (BENNETT; LEYSER, 2006).

Logo, pretendeu-se observar a influência das classes hormonais no desenvolvimento dos meristemas axilares, com a finalidade de analisar a manutenção *in vitro* das estruturas produzidas pelos meristemas axilares em *P. edulis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

### 4.1. Material Vegetal

O material vegetal foi obtido de plantas cultivadas de *P. edulis* a partir de sementes germinadas provenientes de frutos maduros comprados em feira, além de plantas cultivadas a partir da propagação vegetativa por estacas herbáceas, visando o estabelecimento de material vegetal suficiente para a condução dos experimentos. As plantas foram cultivadas em vasos contendo substrato, na casa de vegetação, ao total, 389 vasos. As plantas, mantidas em casa de vegetação, foram irrigadas diariamente através de um sistema de irrigação, e adubadas conforme o desbaste de ramos. As sucessivas podas foram realizadas após a coleta de ápices caulinares, visando estimular a produção de novos ramos e, consecutivamente, a produção de novos ápices caulinares.

Os tratos culturais como poda, adubação, irrigação e controle de pragas como lagartas e ácaros foram de grande importância para o desenvolvimento vigoroso das plantas. Como fonte de explantes para introdução *in vitro*, ápices caulinares foram obtidos de plantas adultas de *P. edulis*, cultivadas em casa de vegetação (Figura 4). A presença de gavinhas e folhas trilobadas caracteriza a fase adulta para a coleta de ápices caulinares (Figura 4E).

Figura 4 - Plantas de *Passiflora edulis* em casa de vegetação em diferentes fases de desenvolvimento. A. Plantas em fase adulta vegetativa, com desenvolvimento de gavinhas e folhas trilobadas, utilizadas para a coleta dos ápices caulinares para introdução *in vitro*; B. Plantas em fase juvenil (folhas lanceoladas de coloração verde-claro) em desenvolvimento para obtenção de material vegetal; C. Desenvolvimento de plantas na fase adulta-reprodutiva em casa de vegetação; D. Desenvolvimento de ramo na fase adulta-reprodutiva (botão floral indicado pela seta branca); E. Ramo excisado de planta adulta para coleta de ápice caulinar.



## 4.2. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *P. edulis*

### 4.2.1. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM sem reguladores de crescimento

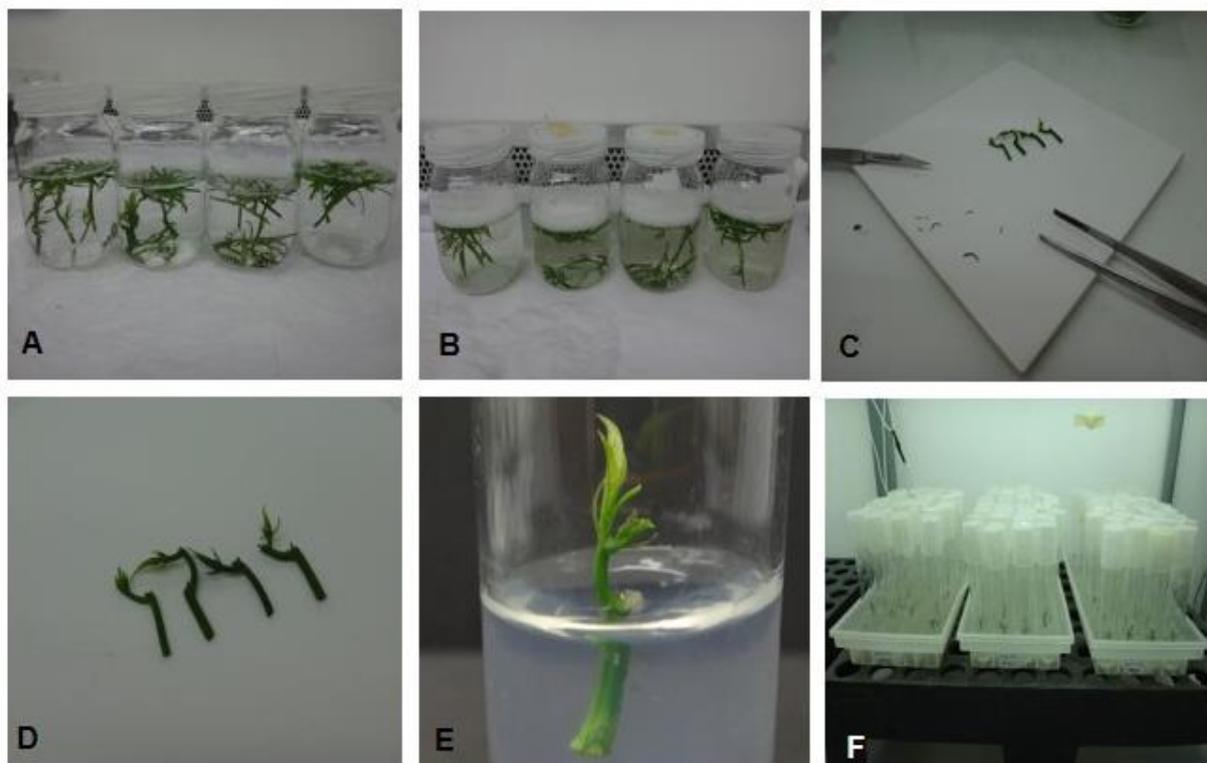
Ápices caulinares de plantas adultas (Figura 4E), seja na fase adulta vegetativa ou reprodutiva, foram coletados manualmente, sendo imersos em frascos com água destilada autoclavada e levados ao laboratório. Para assepsia, em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares foram imersos em solução de etanol (70%), por 1 min (Figura 5A), e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,0 - 2,5 % de cloro ativo) adicionada de 3 a 4 gotas do detergente Tween 20 (0,1%), por 15 minutos (Figura 5B), seguido de 3 a 4 lavagens em água destilada autoclavada. Após assepsia (Figura 5C e 5D), os ápices caulinares foram introduzidos *in vitro* (Figura 5E), em meio de cultura MSM (MONTEIRO et al., 2000)

adicionado de sacarose (3%), além das vitaminas tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina e mioinositol. Nos primeiros experimentos, foi utilizado o meio ½ MS (metade das concentrações de sais) para o desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares. Entretanto, o crescimento das culturas em meio ½ MS foi irrelevante. Os ápices permaneceram inertes e não desenvolveram respostas ao meio de cultura adotado, que se repetiam ao longo dos experimentos instalados.

Para solucionar o problema do baixo crescimento e desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de *P. edulis* cultivados em meio ½ MS, foi utilizado um meio de cultura específico para a cultura do maracujá, desenvolvido por Monteiro et al., (2000). O meio MSM é uma formulação proposta para contornar os problemas de clorose, alongamento retardado e baixa produção de brotos em cultura *in vitro* de diferentes espécies de *Passiflora* cultivadas em meio MS. O meio MSM tem concentrações reduzidas de nitrogênio, potássio, zinco, boro e cloreto, junto com concentrações aumentadas de cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês, cobre, sódio e EDTA, e não contém iodo. A redução de cloreto é realizada pela troca da fonte de cálcio, do cloreto de cálcio para nitrato de cálcio (GARCIA et al., 2011).

O meio de cultura foi ajustado para o pH de 5,8, solidificado com Phytigel (2 %), distribuído em tubos de ensaio (150 X 25 mm), 15 mL por tubo, e esterilizado em autoclave vertical sob temperatura de 120°C por 20 minutos. Após a introdução dos ápices caulinares *in vitro*, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento (Figura 5F) à temperatura de  $27 \pm 1$  °C e intensidade luminosa de 60  $\mu\text{mol.m}^2$ . O experimento foi conduzido em delineamento casualizado em blocos, com três blocos (B1, B2 e B3), com 50 tubos por bloco, totalizando 150 tubos. Os blocos foram instalados a cada 7 dias.

Figura 5 - Assepsia e introdução *in vitro* de ápices caulinares adultos de *Passiflora edulis*. A. Imersão em solução de etanol (70 %) por 1 minuto; B. Imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5 % cloro ativo) + Detergente Tween 20, por 15 minutos; C. Manipulação e limpeza de ápices caulinares; D. Ápices caulinares assépticos para introdução *in vitro*; E. Ápice caulinar introduzido *in vitro* em meio de cultura MSM, medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento; F. Estabelecimento de ápices caulinares em sala de crescimento no 1º dia de cultivo.



Para cada bloco, os ápices caulinares foram subcultivados duas vezes, aos 23 e 52 dias de cultivo para B1, aos 24 e 45 dias de cultivo para B2, e aos 23 e 53 dias de cultivo para B3. As avaliações foram realizadas em períodos compreendidos entre 15 ( $\pm 2$ ), 22 ( $\pm 2$ ), 29 ( $\pm 2$ ), 36 ( $\pm 2$ ) e 43 ( $\pm 2$ ) dias de cultivo, para observar o momento em que ocorreria a reversão à juvenilidade e estruturas formadas, através da observação dos meristemas axilares utilizando o microscópio estereoscópico.

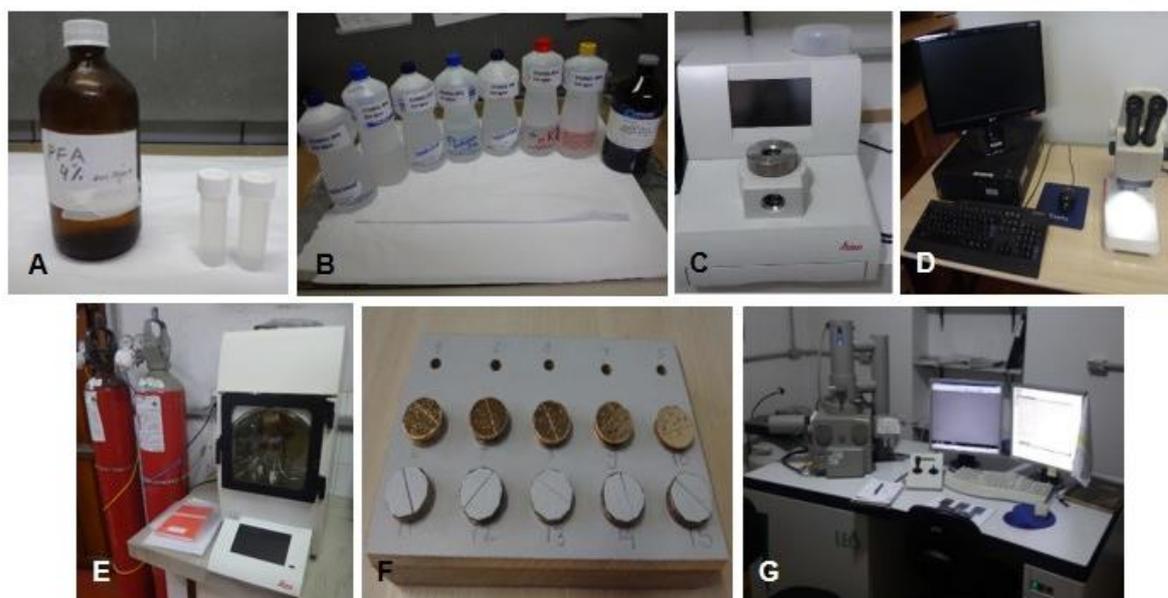
#### **4.2.2. Análise de amostras de ápices caulinares cultivadas em meio MSM sem regulador de crescimento com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura**

Para estudar a ocorrência de reversão à juvenilidade em *P. edulis*, amostras foram coletadas aos 15, 22, 29 e 36 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MSM sem regulador de crescimento. Em cada coleta, 10 amostras foram retiradas dos tubos de ensaio e imersas em solução de paraformaldeído (4 %) submetidas a vácuo por 15 min e em seguida mantidas sob refrigeração, por 48 h, no mesmo fixador e na sequência desidratadas em série etílica por 1 h cada (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 %, esta última por três vezes). Embora o desenvolvimento *in vitro* de culturas de ápices caulinares de *P. edulis* em meio ½ MS tenha sido baixo, amostras foram coletadas e processadas para a observação em microscópio de varredura, conforme descrito anteriormente.

Subseqüentemente, as amostras foram secas ao ponto crítico através de CO<sub>2</sub> (Secador ao Ponto Crítico, Leica CPD300), dissecadas em microscópio estereoscópico, mantendo íntegros o meristema apical caulinar, primórdios foliares e meristemas axilares, afixados em suportes metálicos com fita dupla face (3M, Brasil), metalizadas com ouro (Metalizador, Leica EM-300), sendo observadas a 10-20 kV sob um microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (Oberkochen, Alemanha), no Núcleo de Apoio a Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA), ESALQ/USP, Piracicaba, SP (Figura 6).

Através das análises realizadas, foram capturadas micrografias das amostras em cada intervalo de tempo, com a finalidade de observar, ou não, a ocorrência da reversão à juvenilidade, caracterizada pela formação de uma gema axilar ao invés de uma gavinha ou flor na axila da folha em ápices caulinares de plantas adultas, além de caracterizar as fases de desenvolvimento de *P. edulis*.

Figura 6 - Processamento de amostras de ápices caulinares de plantas adultas de *Passiflora edulis* para observação em microscópio eletrônico de varredura. A. Fixação em solução de paraformaldeído (4 %), por 48 h; B. Desidratação em série etílica (30-100%), por 1 h cada; C. Secagem das amostras ao ponto crítico através de CO<sub>2</sub>; D. Dissecção e montagem de amostras com auxílio de microscópio estereoscópico; E. Metalização de amostras com ouro; F. Amostras metalizadas para observação em microscópio eletrônico de varredura; G. Análise das amostras e captura de imagens em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, NAP/MEPA, ESALQ/USP.



#### 4.2.3. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com reguladores de crescimento

As condições de cultivo *in vitro* adotadas para este experimento foram as mesmas condições descritas acima, entretanto, aos meios de cultura foram adicionadas diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento casualizado em blocos, em que cada bloco constituído por 11 tratamentos, sendo o controle (T11) e 10 tratamentos (T1-T10) com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações de reguladores de crescimento adicionadas ao meio MSM, nos tratamentos (T1 a T10) utilizados no cultivo *in vitro* de ápices caulinares de plantas de *Passiflora edulis*.

1µM	10µM
<b>T1: Ácido naftaleno-acético (ANA)</b>	<b>T2: Ácido naftaleno-acético (ANA)</b>
<b>T3: 6- benziloaminopurina (BAP)</b>	<b>T4: 6- benziloaminopurina (BAP)</b>
<b>T5: Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)</b>	<b>T6: Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)</b>
<b>T7: Inibidor do transporte polar de auxina: Ácido naftil-ftalâmico (NPA)</b>	<b>T8: Inibidor do transporte polar de auxina: Ácido naftil-ftalâmico (NPA)</b>
<b>T9: Inibidor da síntese de giberelina: Paclobutrazol (PACLO)</b>	<b>T10: Inibidor da síntese de giberelina: Paclobutrazol (PACLO)</b>
<b>T11: Tratamento controle (Meio MSM)</b>	

Cada tratamento foi constituído de 20 tubos, cada um contendo 15 mL de meio de cultura e 1 ápice caulinar, totalizando 220 tubos. O experimento foi instalado em três blocos, para garantir um número adequado de ápices para a realização das análises com auxílio de microscópio estereoscópico. Os blocos foram denominados Experimento com regulador de crescimento, Bloco 1 (RC-B1), Experimento com regulador de crescimento, Bloco 2 (RC-B2) e Experimento com regulador de crescimento, Bloco 3 (RC-B3). Foram realizados subcultivos para novos meios de cultura em todos os blocos, aos 30 (RC-B1), 28 (RC-B2) e 34 (RC-B3) dias de cultivo, respectivamente.

As avaliações foram realizadas em períodos compreendidos entre 7 ( $\pm 2$ ), 15 ( $\pm 2$ ), 22 ( $\pm 2$ ), 29 ( $\pm 2$ ), 36 ( $\pm 2$ ) e 43 ( $\pm 2$ ) dias de cultivo para observar o efeito dos reguladores de crescimento e concentrações no desenvolvimento dos ápices caulinares *in vitro*, avaliando-se as estruturas presentes nos ápices como gemas, folhas, estípulas, gavinhas e botões florais.

#### **4.2.4. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com BAP na concentração de 10 $\mu$ M**

As condições de cultivo *in vitro* adotadas para o experimento foram as mesmas condições descritas no item 4.2.1., entretanto, utilizou-se a concentração de 10  $\mu$ M do regulador de crescimento BAP adicionada ao meio de cultura.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando 40 tubos. As avaliações foram realizadas aos 35 dias de cultivo, para observar a ocorrência da reversão à juvenilidade, que pode ser elucidada como a formação *de novo* de estruturas pertencentes a fases anteriores do desenvolvimento da planta.

#### **4.2.5. Análise de amostras de ápices caulinares cultivadas em meio MSM com regulador de crescimento com o auxílio de microscópio estereoscópico**

As análises das amostras de ápices caulinares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP). Para tal, visando estudar a resposta dos ápices caulinares adultos de *P. edulis* cultivados em meios de cultura com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, amostras foram analisadas aos 7, 15, 22, 29, 36 e 43 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MSM, nas diferentes concentrações de alguns reguladores de crescimento.

Em cada intervalo, amostras foram avaliadas com o auxílio de microscópio estereoscópico (Leica EZ4E), a fim de registrar a manutenção e/ou desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos. A partir de uma câmera acoplada ao microscópio estereoscópico e do programa Leica Application Suite (LAS EZ, Versão 3.2.0), foram capturadas imagens das amostras em cada coleta, com a finalidade de observar a ocorrência, ou não, da reversão à juvenilidade, assim como registrar a manutenção e/ou desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos, bem como identificar as fases de desenvolvimento das amostras de cada tratamento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *P. edulis*

#### 5.1.1. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM sem reguladores de crescimento

Ao longo de 60 dias de cultivo, em avaliações semanais, os ápices caulinares foram observados e analisados, sendo monitorados conforme o desenvolvimento ou formação de alguma estrutura que pudesse determinar a condição de reversão à juvenilidade, como a presença de gemas axilares, buscando determinar em quantos dias a reversão ocorreria. Nos três blocos instalados (B1, B2 e B3) não foi observada a presença de gemas axilares em nenhuma repetição. Os ápices também não apresentaram crescimento *in vitro*, o que foi um fator que pode ter marcado a não-ocorrência da reversão.

Entretanto, houve evidências de que alguns ápices caulinares pudessem ter sido revertidos, pela observação de folhas que pareciam ser lanceoladas. Estes ápices que, possivelmente, apresentaram diferenças em sua morfologia foliar, foram separados, processados e avaliados por microscopia eletrônica de varredura.

A hipótese era de que a reversão à juvenilidade ocorreria após a introdução *in vitro* de ápices caulinares adultos de *P. edulis* em meio de cultura (seja MS ou MSM), sem adição exógena de hormônios ou reguladores de crescimento. Com base em observações anteriores, presumia-se que os ápices caulinares provenientes de ramos adultos deixariam de formar de gavinhas e/ou botões florais, caracterizando o retorno à fase juvenil, alguns dias após a introdução *in vitro* do material, desenvolvendo apenas gemas axilares. Entretanto, nas primeiras tentativas dos experimentos com introdução *in vitro*, foi observado que este fenômeno não ocorria nas condições adotadas neste trabalho.

Os ápices caulinares não apresentaram desenvolvimento de estruturas pré-formadas, como os primórdios foliares, assim como gavinhas, botões florais e gemas axilares. As análises realizadas em microscópio eletrônico de varredura foram fundamentais para a conclusão de que os ápices caulinares realmente não apresentaram nenhuma distinção ou desenvolvimento ao longo dessas estruturas.

### 5.1.2. Análise de estádios de desenvolvimento de ápices caulinares cultivadas em meio MSM sem regulador de crescimento

As micrografias eletrônicas indicam que a reversão não ocorreu nos ápices caulinares adultos de *P. edulis* quando cultivados em meio  $\frac{1}{2}$  MS sem adição de reguladores de crescimento (Figura 7). Esperava-se que os ápices caulinares apresentassem desenvolvimento para que houvesse a formação de novas estruturas ao longo do cultivo de 36 dias, entretanto, não foi possível observar a ocorrência da reversão *in vitro* nas condições de cultivo adotadas para o experimento. As análises por MEV mostram, que não houve continuidade no desenvolvimento das estruturas presentes nos explantes, após a introdução *in vitro*.

Desta forma não ocorrendo a formação de novos meristemas, seja com características adultas (gavinha/botão floral), seja com características juvenis (gema axilar apenas). Os ápices caulinares também foram cultivados em meio de cultura MSM sem adição de reguladores de crescimento com o intuito de registrar a ocorrência da reversão *in vitro*, entretanto. Os resultados em meio MSM (Figura 8) foram semelhantes aos obtidos para os ápices cultivados em meio  $\frac{1}{2}$  MS (Figura 7).

As condições de meio de cultura, concentrações de reguladores e tipo de explantes adotadas para o experimento não permitiram a observação de reversão *in vitro* (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS sem adição de reguladores de crescimento após 15 (A), 22 (B), 29 (C) e 36 (D) dias de cultivo *in vitro*. Legenda: bf = botão floral; es = estípula; ga = gema axilar; gv = gavinha; mac = meristema apical caulinar; mx = meristema axilar; pf = primórdio foliar. Barras: A, C = 100  $\mu$ m; B, D = 200  $\mu$ m.

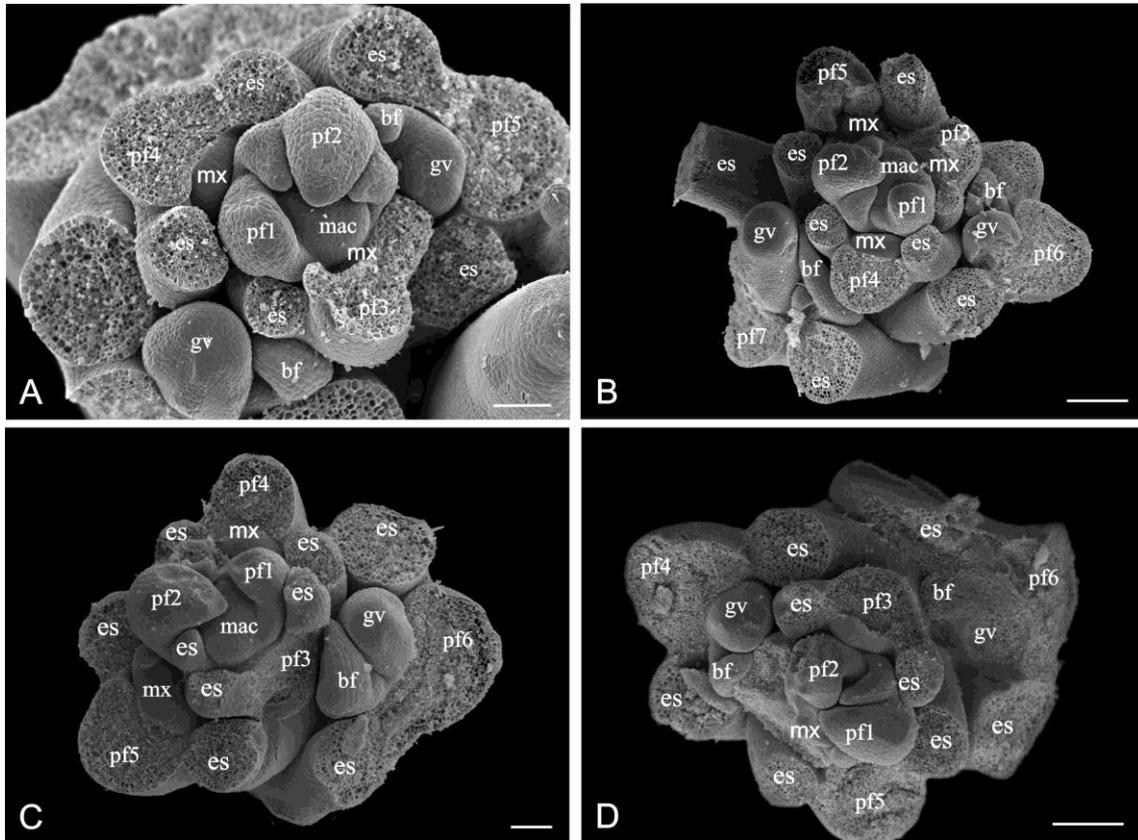
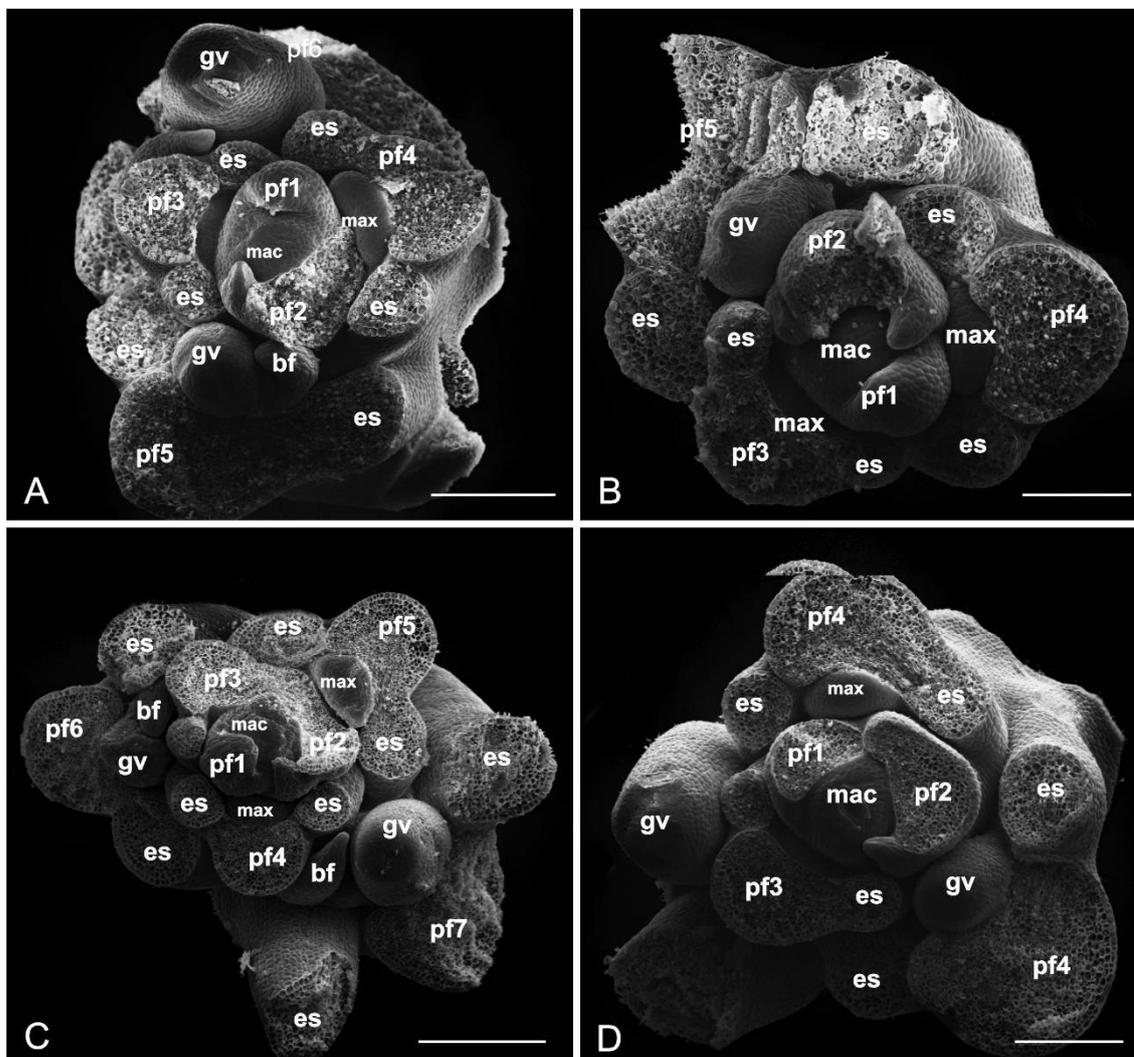


Figura 8 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio de cultura MSM sem adição de fitorreguladores, após 15 (A), 22 (B), 29 (C) e 36 (D) dias de cultivo *in vitro*. Legenda: bf = botão floral; es = estípula; ga = gema axilar; gv = gavinha; mac = meristema apical caulinar; max = meristema axilar; pf = primórdio foliar. Barras: A, D = 200  $\mu$ m; B, C = 300  $\mu$ m.

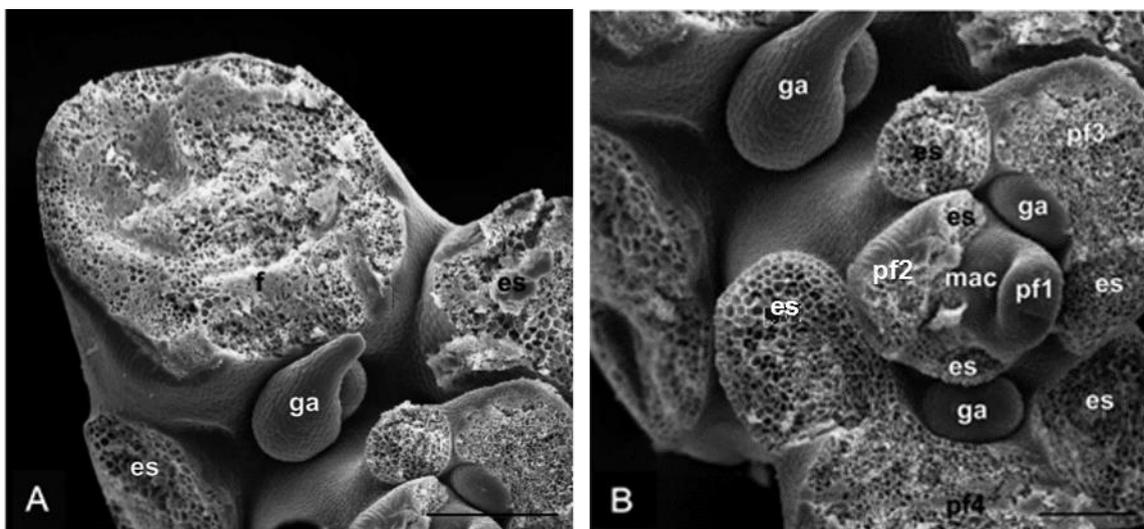


### 5.1.3. Caracterização das fases de desenvolvimento de ápices caulinares de *Passiflora edulis*

Através de observações ao microscópio eletrônico de varredura, foi possível caracterizar as diferentes fases do desenvolvimento de ápices caulinares de *P. edulis*. Na fase juvenil, ocorre o desenvolvimento de gemas axilares, que se desenvolvem nas axilas das folhas (Figura 9A). A disposição que as folhas se apresentam, denominado filotaxia, é espiralada, sendo o primórdio foliar mais novo aquele mais próximo do meristema apical caulinar.

Os fitômeros da fase juvenil são constituídos por uma folha lanceolada, uma gema axilar e um par de estípulas (Figura 9B). Durante a fase juvenil, as plantas não possuem a capacidade de florescimento, uma vez que não foi alcançada a competência reprodutiva pelas mesmas, desta forma as plantas crescem apenas vegetativamente. A fase juvenil termina quando as plantas adquirem a capacidade de produção de gemas.

Figura 9 - Fase juvenil de ápices caulinares de *Passiflora edulis*. A. Gema axilar (ga) e primórdio foliar (pf), formados na axila da folha (f), podendo-se também observar as estípulas (es) (estípulas e folha foram retiradas para melhor visualização); B. Disposição dos primórdios 1 a 4 (pf1 a pf4) em um ápice caulinar juvenil. Legenda: es = estípula; f = folha; ga = gema axilar; mac = meristema apical caulinar; pf = primórdio foliar. Barras: A = 150  $\mu$ m; B = 250  $\mu$ m.



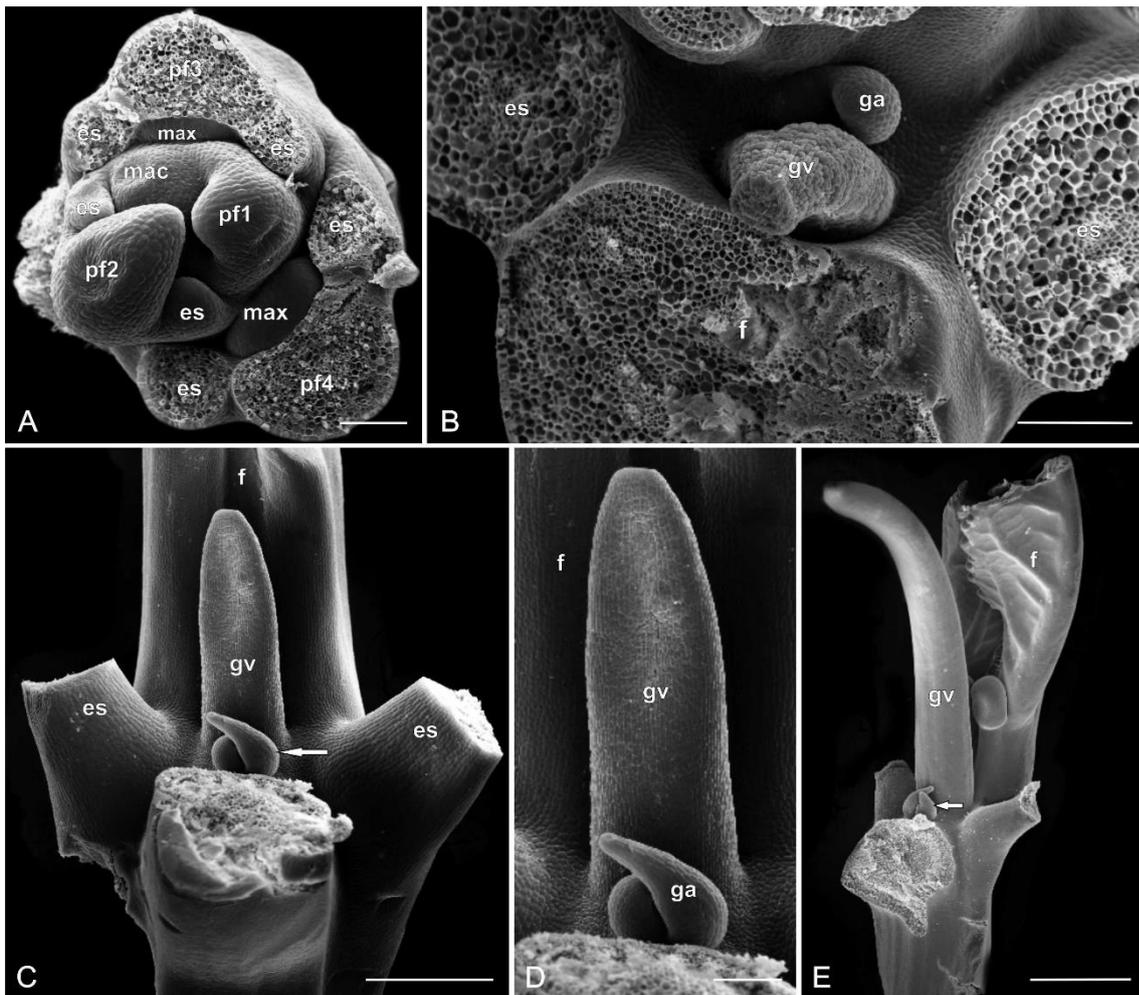
A fase adulta em *P. edulis*, pode ser ainda subdividida em adulta vegetativa e adulta-reprodutiva, em que estruturas morfológicas diferentes caracterizam as transições entre as fases do desenvolvimento em *P. edulis*. Durante a fase adulta vegetativa, através dos meristemas axilares, são formadas as gavinhas, sendo considerada, adaptação do gênero *Passiflora*, que conferem vantagem ao desenvolvimento das plantas, uma vez que estas espécies necessitam de grande quantidade de luz, desta forma as gavinhas permitem o suporte dos ramos, permitindo o crescimento em busca de luz.

Segundo Nave et al. (2010) as gavinhas são formadas através dos meristemas axilares. Um grupo de células na base adaxial dos primórdios foliares dão início a divisões celulares e formam um meristema que se torna claramente visível quando são formados, aproximadamente, três a quatro primórdios foliares próximos ao meristema apical caulinar (Figura 10 A).

Na fase adulta vegetativa, o meristema axilar forma uma gema vegetativa e uma gavinha; (Figura 10B), a gema axilar pode permanecer dormente ou ser ativada, conforme a necessidade do desenvolvimento da planta.

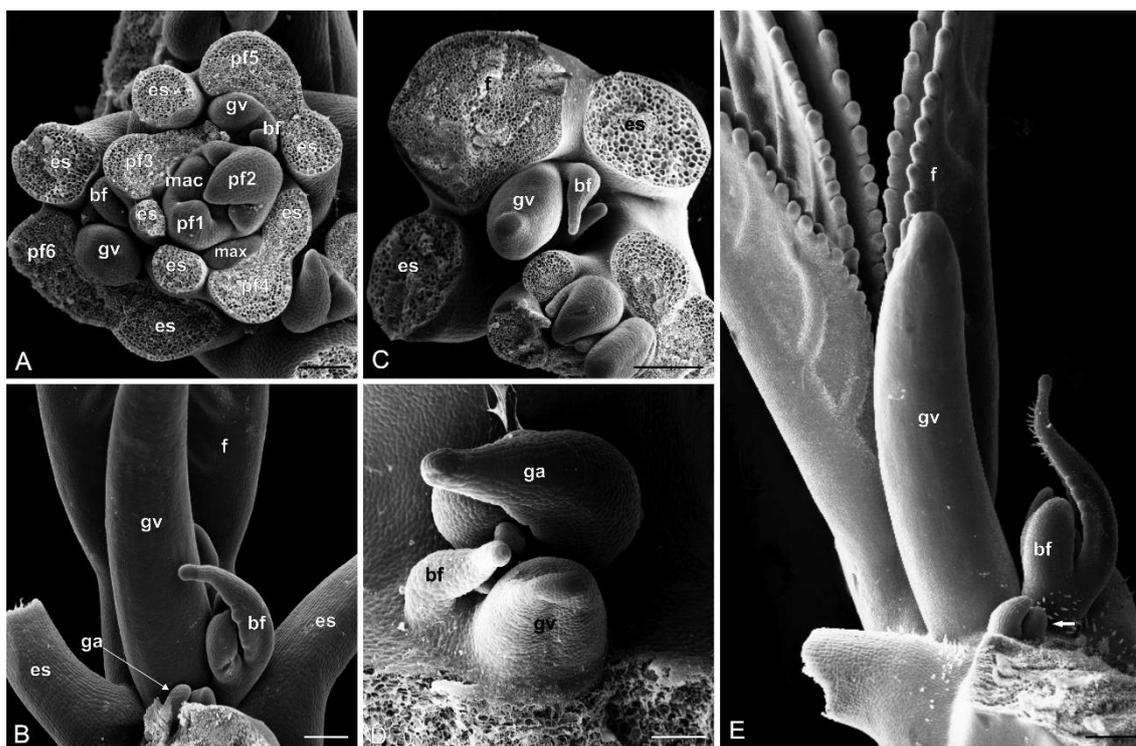
O meristema vegetativo axilar se torna visível quando 5 primórdios foliares, aproximadamente, são formados no ápice. Este meristema é ligeiramente distanciado da base da folha do pecíolo, com a gema axilar sendo formada na face adaxial da gavinha (Figura 10C-E). Durante esta etapa, as plantas adquirem a competência reprodutiva. Os fitômeros da fase adulta vegetativa são constituídos por uma folha trilobada, uma gavinha, uma gema axilar e um par de estípulas (Figura 10A). As folhas trilobadas aparecem após a produção de 14 a 16 fitômeros jovens (NAVE et al., 2010).

Figura 10 - Fase adulta vegetativa de ápices caulinares de *Passiflora edulis*. A. Disposição de primórdios em um ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Fitômero de um ápice caulinar na fase adulta vegetativa constituído de uma gavinha (gv), gema axilar (ga), primórdio foliar (pf), e um par de estípulas (es); C. Gavinha com aproximadamente 1,5 mm de comprimento mostrando uma gema axilar (ga) já desenvolvida na face adaxial da gavinha (seta); D. Detalhe da imagem em C; E. Disposição da gavinha na face adaxial da folha e da gema axilar na face adaxial da gavinha. Legenda: es = estípula; f = folha; ga = gema axilar; gv = gavinha; mac = meristema apical caulinar; max = meristema axilar; pf = primórdio foliar. Barras: A = 200  $\mu$ m; B = 300  $\mu$ m; C, E = 1mm; D = 0,5 mm.



Na fase adulta reprodutiva, os fitômeros são constituídas por um botão floral, uma gavinha, folhas trilobadas, uma gema axilar localizada adaxialmente à gavinha, além de um par de estípulas (Figura 11A). Os meristemas axilares subdividem-se em dois domos (Figura 11C), originando uma gavinha e um botão floral (Figura 11D), concomitantemente, além do desenvolvimento da gema axilar localizado adaxialmente à gavinha (Figura 11B, D, E).

Figura 11 - Fase adulta reprodutiva de ápices caulinares de *Passiflora edulis*. A. Disposição dos primórdios em um ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Fitômero de um ápice caulinar na fase adulta reprodutiva constituído de um botão floral (bf), gavinha (gv), gema axilar (ga) (seta), primórdio foliar (pf), e um par de estípulas (es); C-E. Detalhes das imagens mostradas em A e B. Legenda: bf = botão floral; es = estípula; f = folha; ga = gema axilar; gv = gavinha; mac = meristema apical caulinar; max = meristema axilar; pf = primórdio foliar. Barras: A = 300 µm; B, D = 200 µm; C, E = 1mm.

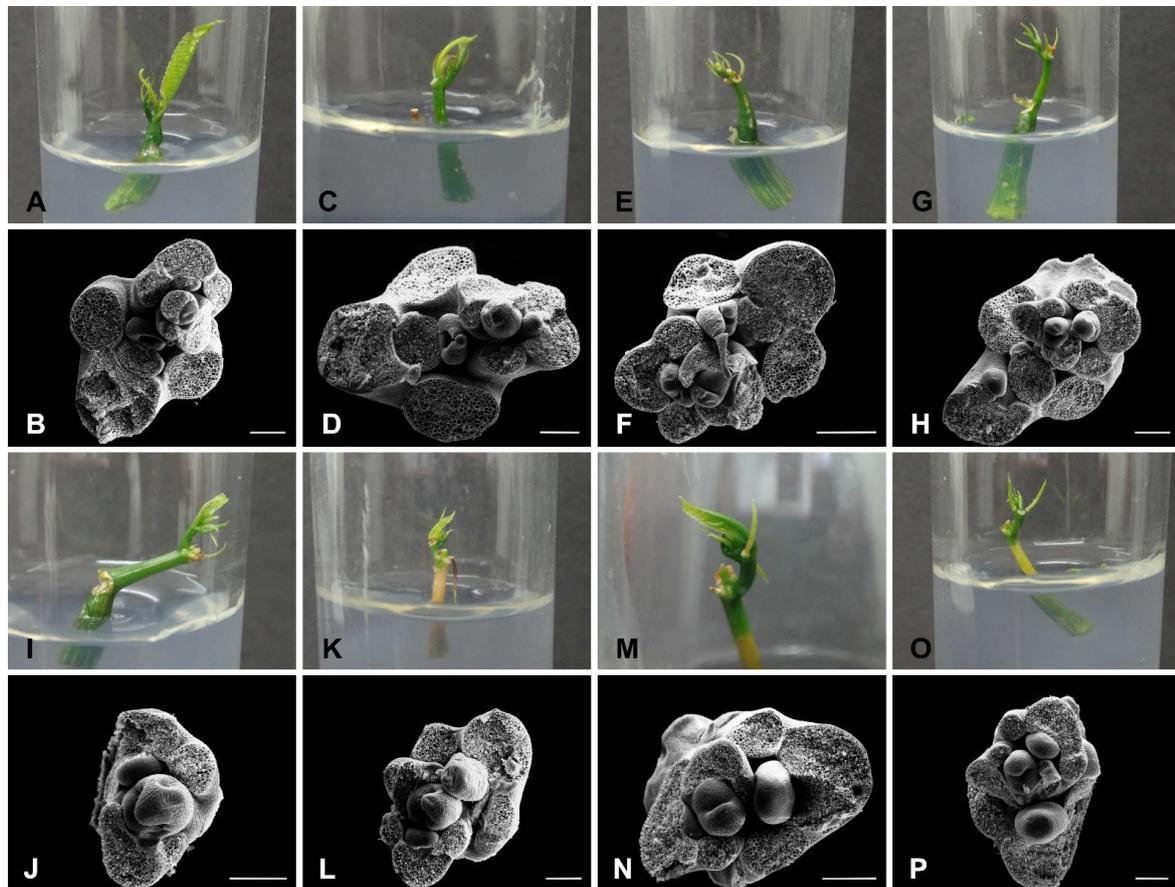


#### 5.1.4. Análise de amostras de ápices caulinares “possivelmente revertidos” cultivados em meio MSM sem regulador de crescimento

Observou-se uma diferença na morfologia de algumas folhas em ápices caulinares cultivados *in vitro* em meio de cultura MSM sem adição de fitorreguladores. Tais diferenças foram caracterizadas como folhas contendo apenas dois lobos, uma vez que plantas adultas de *P. edulis* apresentam folhas trilobadas (com três lóbulos). Logo, supôs-se que ocorreria a reversão. Entretanto, foi observado sob microscopia de varredura que após a introdução *in vitro* não houve a formação de novos primórdios nestes ápices.

Pressupõe-se que os ápices caulinares, quando coletados no campo, encontravam-se em transição de fases do desenvolvimento e isto pode ser evidenciado pela alteração na morfologia das folhas, o que foi observado no momento das coletas para introdução de material *in vitro*. A Figura 12 mostra algumas amostras de ápices caulinares que foram selecionados como sendo ápices possivelmente revertidos, e que, através das observações sob o microscópio de varredura, sugere-se que não houve modificações ou a reprogramação dos meristemas axilares, para a formação de meristemas axilares que apresentassem o rejuvenescimento, ocorrido *in vitro* nesses ápices. Dessa forma, a hipótese inicial que previa a reprogramação dos produtos dos meristemas axilares foi refutada.

Figura 12 - Ápices caulinares possivelmente revertidos. A. Amostra E2-11; B. Micrografia eletrônica da amostra E2-11; C. Amostra E2-16; D. Micrografia eletrônica da amostra E2-16; E. Amostra E2-24; F. Micrografia eletrônica da amostra E2-24; G. Amostra E2-37; H. Micrografia eletrônica da amostra E2-37; I. Amostra E2-57; J. Micrografia eletrônica da amostra E2-57; K. Amostra E2-66; L. Micrografia eletrônica da amostra E2-66; M. Amostra E2-75; N. Micrografia eletrônica da amostra E2-75; O. Amostra E2-85; P. Micrografia eletrônica da amostra E2-85. Barras: B, D, H, J, L, N, P = 200µm; F = 300 µm.



### 5.1.5. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com reguladores de crescimento

Pretendeu-se observar o efeito dos reguladores de crescimento e de alguns inibidores adicionados ao meio de cultura MSM, no fenômeno da reversão à juvenilidade. Ao longo de 60 dias de cultivo *in vitro*, em avaliações semanais, os ápices caulinares foram observados e analisados, sendo monitorados conforme o desenvolvimento ou formação de alguma estrutura que pudesse determinar a condição de reversão à juvenilidade.

As análises ao microscópio estereoscópico corroboraram para otimizar a caracterização das fases de desenvolvimento de ápices caulinares de *P. edulis*, assim como contribuíram para registrar quais estruturas se mantêm presentes durante esta fases e seus comportamentos quando cultivados em meio de cultura, tais fatores, favorecem a descrição morfológica de maneira mais detalhada.

Dentre os tratamentos T1 à T11 nos três blocos instalados Bloco 1 (RC-B1), Bloco 2 (RC-B2) e Bloco 3 (RC-B3), não foi observada em nenhuma repetição, a ocorrência de reversão, exceto nos tratamentos T4 que apresentavam a adição da citocinina BAP na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , foi observada a formação de brotos a partir de gemas axilares. Os demais tratamentos não apresentaram respostas aos reguladores e inibidores, sendo que os ápices caulinares não desenvolveram nenhuma estrutura. Neste trabalho, optou-se por caracterizar os tratamentos referentes ao bloco RC-B1, evidenciando o desenvolvimento das estruturas, comportamento *in vitro*, assim como respostas aos meios de cultura adicionados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e inibidores.

Não foi realizada a análise dos ápices caulinares sob a metodologia da microscopia eletrônica de varredura, devido à inviabilidade na metodologia, uma vez que não foi observada a ocorrência de reversão *in vitro* ainda nos experimentos sem reguladores de crescimento.

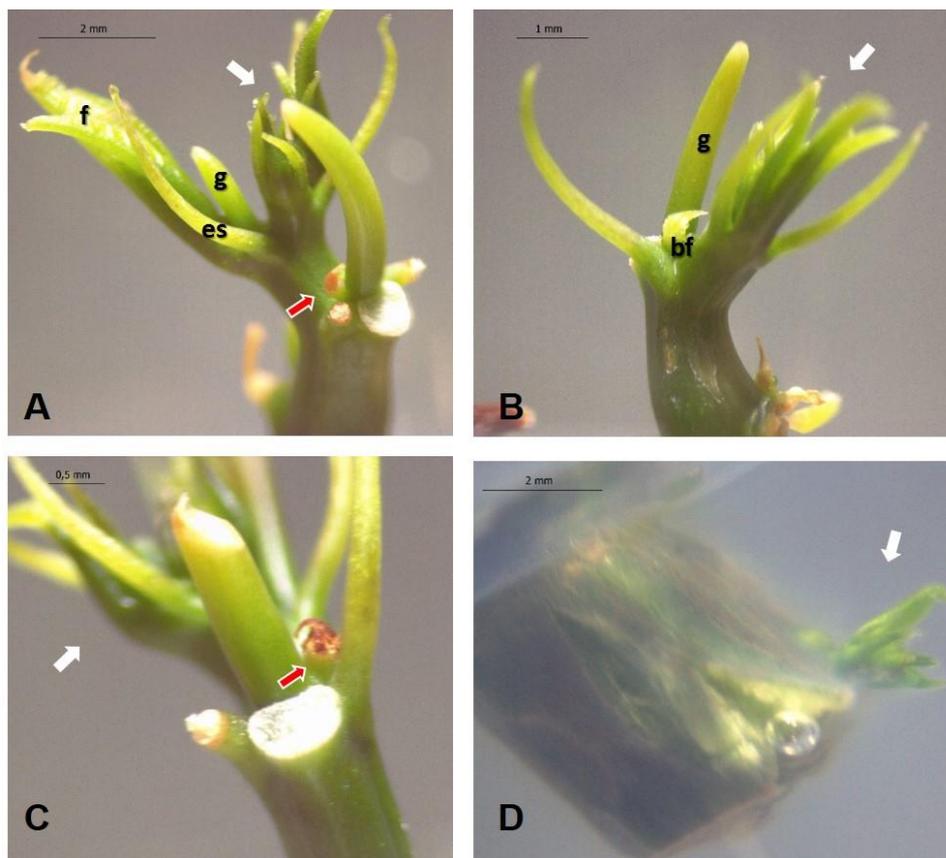
## Tratamentos referentes ao bloco RC-B1

### Tratamento T1 (ANA 1 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 13). Em alguns ápices caulinares, observou-se a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações (Figura 13B). Infere-se que os primórdios florais já estavam presentes no material em campo, anteriormente à coleta. Durante o cultivo *in vitro* houve manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

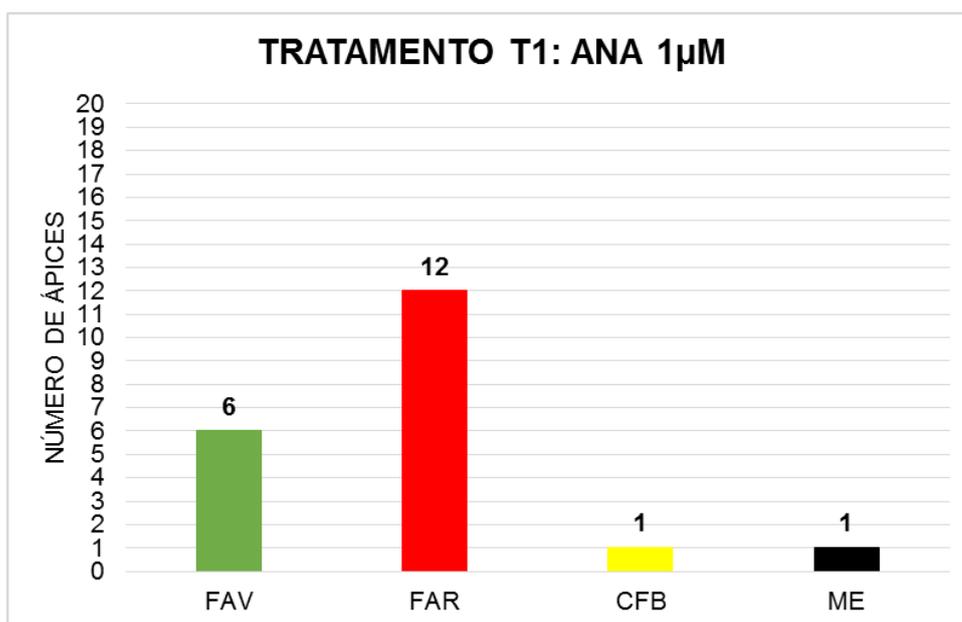
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 13A, C). Também ocorreu a formação de broto adventício na base do explante (Figura 13D). A auxina ANA, nos tratamentos T1 e T2, não promoveu a formação de raízes nem o desenvolvimento posterior de brotações. Em vez da formação das raízes, o tratamento T2 (ANA 10 $\mu$ M) produziu calos na extremidade basal dos explantes (Figura 13C). Apesar desse tecido de calos não pareça ser organogênico, com células largas e soltas, houve a formação de gema adventícia intercalada com células calosas como descrito por Biasi et al. (2000) (Figura 13D).

Figura 13 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com ANA 1  $\mu$ M (tratamento T1). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (folhas trilobadas, gavinhas e estípulas) (seta branca), além do abortamento de botões florais (seta vermelha). Ápice caulinar na fase adulta-reprodutiva; B. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Manutenção do botão floral e gavinha. Ápice caulinar na fase adulta-reprodutiva; C. Manutenção de folhas trilobadas, gavinhas e estípulas próximas à região do MAC (seta branca), além de abortamento floral (seta vermelha). Ápice caulinar na fase adulta-vegetativa; D. Formação de gema na base do explante (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, D = 2 mm; B = 1 mm; C = 0,5 mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Seis amostras (tubos 3,5,6,7,8,16) foram caracterizadas como na fase adulta-vegetativa, e doze amostras (tubos 1,2,9,10,11,12,13,14,15,18,19,20), como na fase adulta-reprodutiva (Figura 14).

Figura 14 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e ANA 1 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação bacteriana ou fúngica; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

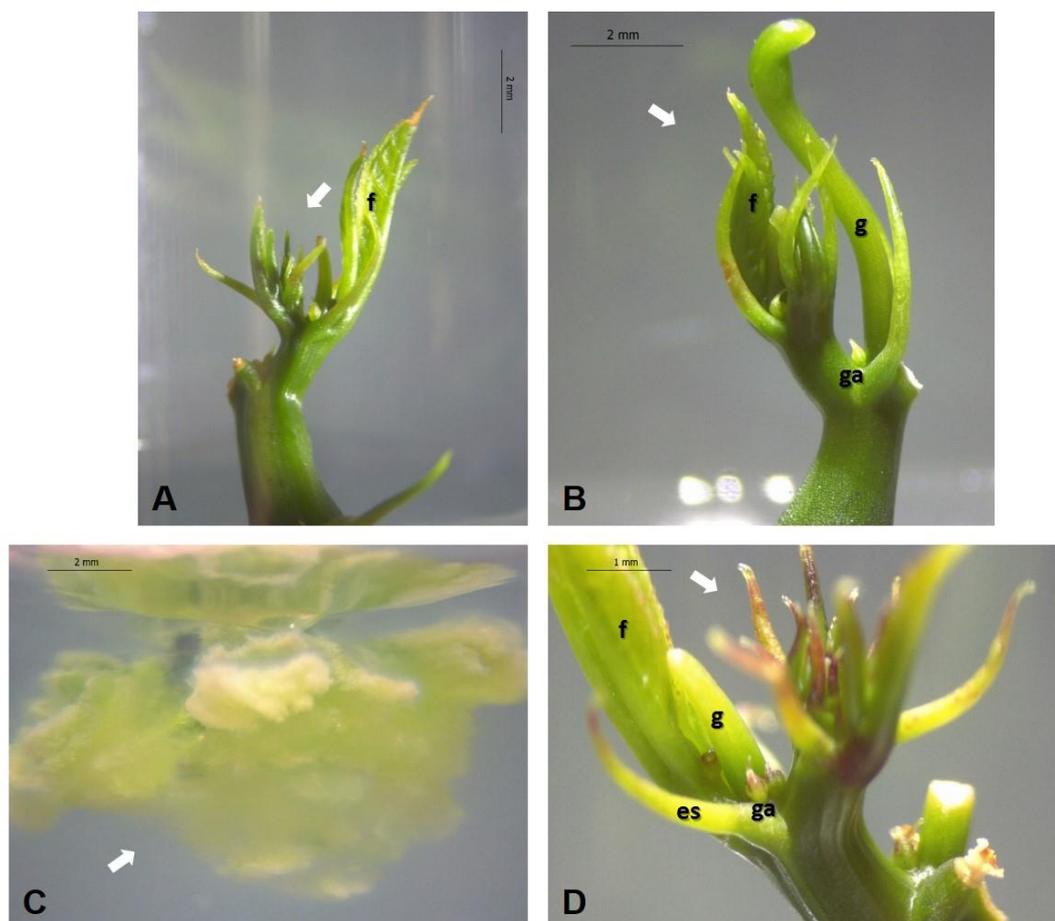


### Tratamento T2 (ANA 10 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 15A,B,D). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

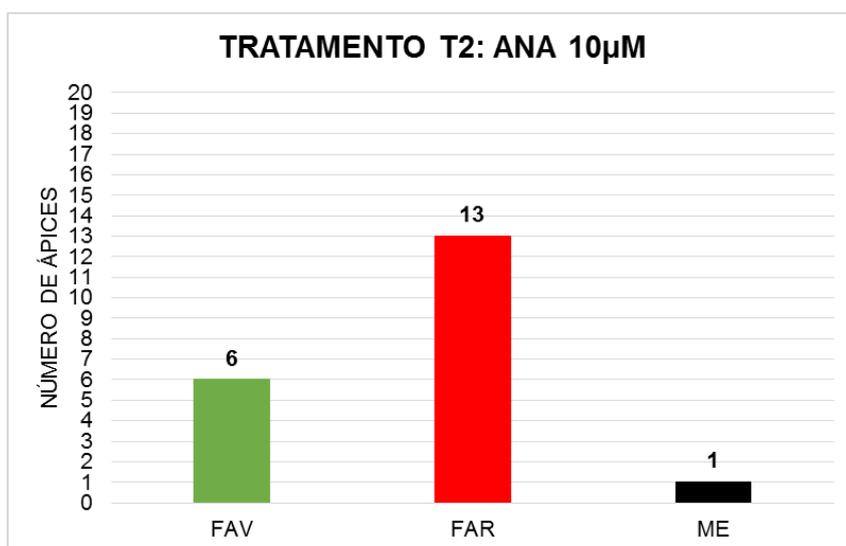
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio. A formação de calos foi expressiva para este tratamento (Figura 15C).

Figura 15 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com ANA 10 $\mu$ M (tratamento T2). A. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; C. Formação de calos na base do explante (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; D. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha, ga = gema axilar. Barras: A, C = 2mm; D = 1mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Seis amostras (tubos 2,6,7,8,9,10) foram caracterizadas como na fase adulta-vegetativa, e treze amostras (tubos 1,3,4,5,11,12,14,15,16,17,18,19,20), como na fase adulta-reprodutiva (Figura 16).

Figura 16 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e ANA 10 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

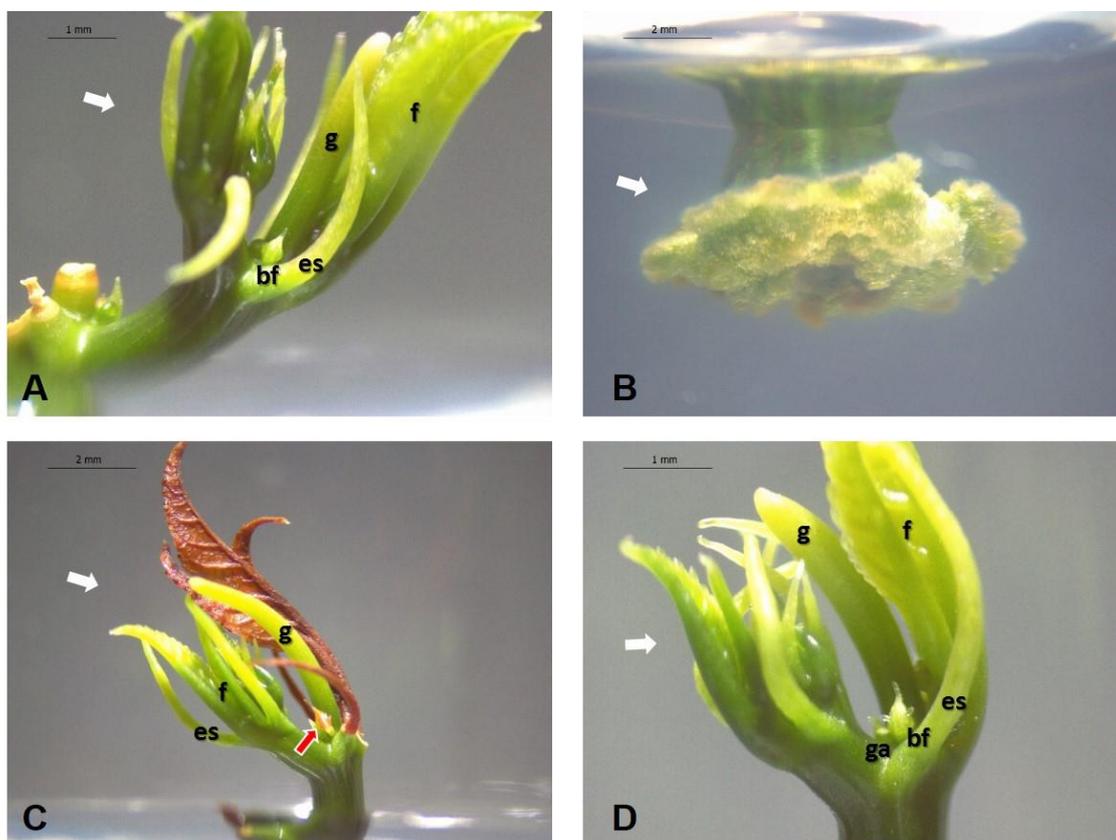


### Tratamento T3 (BAP 1 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 17). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta (Figura 17A, D). De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

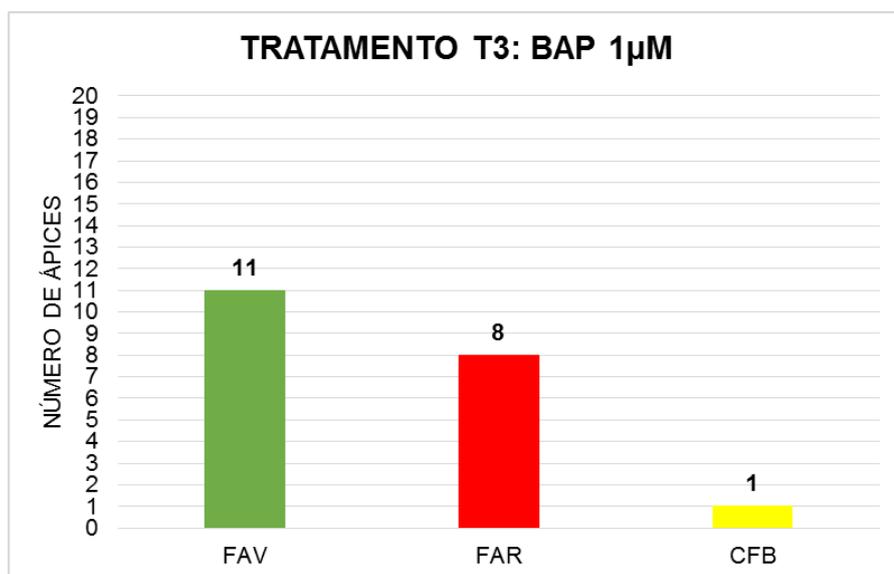
Em algumas amostras, houve a formação de calos na base do explante (Figura 17B). Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 17C).

Figura 17 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com BAP 1 $\mu$ M (tratamento T3). A. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Formação de calos na base do explante. Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; C. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Abortamento de botões florais (seta vermelha). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; D. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, D = 1 mm; B, C = 2 mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Onze amostras (tubos 1,3,4,5,7,8,9,12,17,18,20) foram caracterizadas como na fase adulta-vegetativa, e oito amostras (tubos 2,6,11,13,14,15,16,19), como na fase adulta-reprodutiva (Figura 18).

Figura 18 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e BAP 1 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva.



#### Tratamento T4 (BAP 10 $\mu$ M)

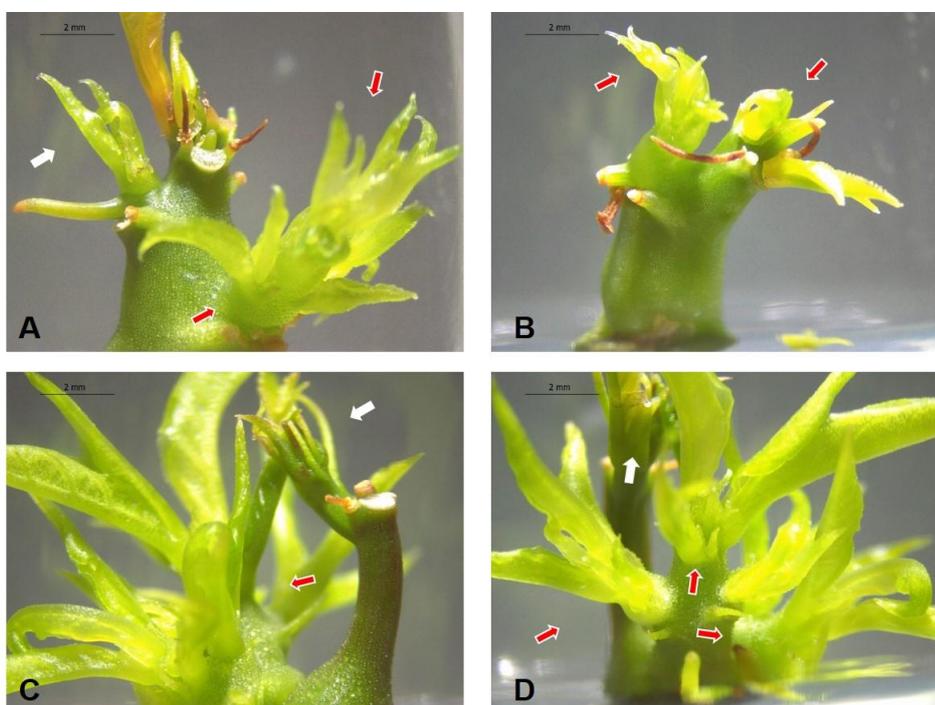
Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (gavinhas, estípulas). Em alguns ápices caulinares, foi observada a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte,

caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio.

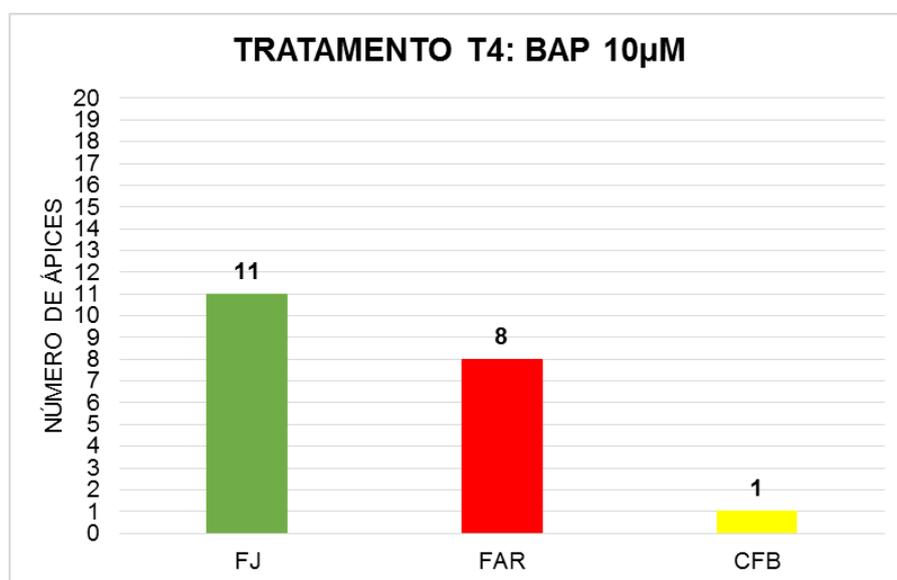
Neste tratamento, o desenvolvimento de gemas axilares foi expressivo, ocorrendo em quase todas as repetições, além do desenvolvimento de folhas trilobadas (DFT) e desenvolvimento de folhas lanceoladas (DFL). Infere-se que a concentração de BAP neste tratamento foi favorável ao desenvolvimento de gemas axilares. Houve formação de gemas adventícias em quase todos os explantes (Figura 19A-D).

Figura 19 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com BAP 10 $\mu$ M (tratamento T4). A. Desenvolvimento de gemas axilares (seta branca). Desenvolvimento de gemas adventícias (setas vermelhas). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Desenvolvimento de gemas adventícias. Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; C. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Desenvolvimento de gemas adventícias. Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; D. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas). Desenvolvimento de gemas adventícias (setas vermelhas). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa. Barras: A, D = 2 mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Neste tratamento, foi possível avaliar e caracterizar os ápices caulinares quanto à fase juvenil, uma vez que houve desenvolvimento considerável de gemas adventícias em quase todas as repetições, além de não ter sido possível observar a manutenção e/ou abortamento de botões florais, assim como outros órgãos (Figura 20).

Figura 20 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e BAP 10 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAR = Fase adulta reprodutiva; FJ = Fase juvenil.



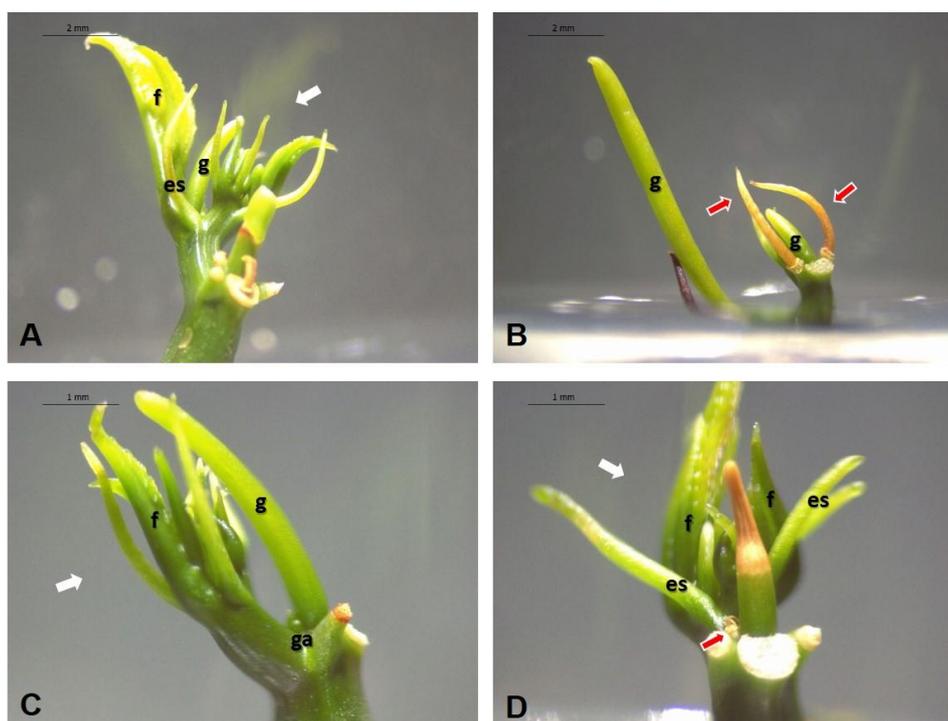
### Tratamento T5 (GA<sub>3</sub> 1 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 21A). Em alguns ápices caulinares, foi observada a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares. Em algumas amostras, houve o crescimento de gavinhas (Figura 21B, C).

Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 21B, D).

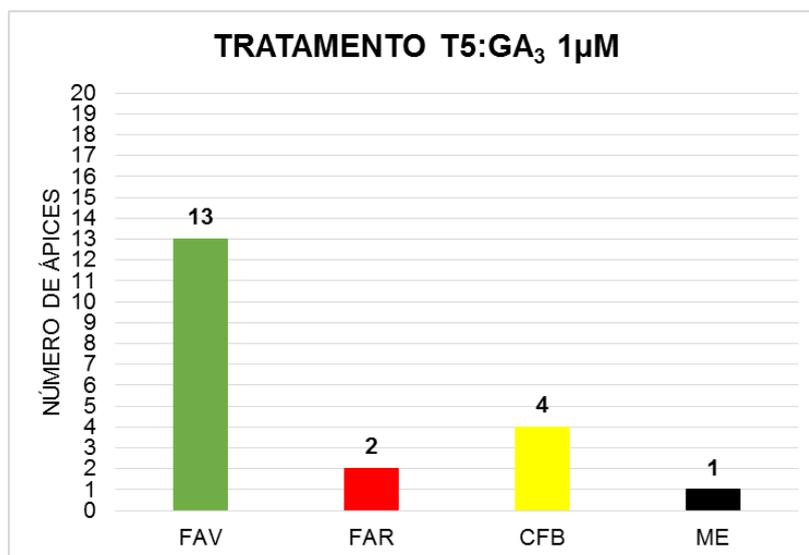
Os explantes cultivados em GA<sub>3</sub> na concentração de 1 µM (tratamento T5) apresentaram desenvolvimento e manutenção das gavinhas (Figura 21B, C). As giberelinas tipicamente não desempenham um grande papel na regulação do desenvolvimento *in vitro* (GABA, 2004). Quando o GA<sub>3</sub> é adicionado ao meio de cultura do tecido vegetal, ele frequentemente diminui ou previne a formação de raízes adventícias, brotos ou embriões somáticos (MOSHKOV et al., 2008). Embora o GA<sub>3</sub> tenda a impedir a formação de meristemas organizados de raízes e brotos em culturas de tecidos, pode ajudar no crescimento e desenvolvimento de órgãos pré-formados (GEORGE; HALL; KLERK, 2008c).

Figura 21 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com GA<sub>3</sub> 1µM (tratamento T5). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas, folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Manutenção e crescimento de gavinhas. Abortamento de fitômeros periféricos (setas vermelhas). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; C. Manutenção e crescimento de gavinhas. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa. D. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Abortamento de botão floral. Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha, ga = gema axilar. Barras: A, B = 2 mm; C, D = 1 mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Treze amostras (tubos 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19) foram caracterizadas como na fase adulta-vegetativa, e duas amostras (tubos 3,13), como na fase adulta-reprodutiva (Figura 22).

Figura 22 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e GA<sub>3</sub> 1μM em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta-vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

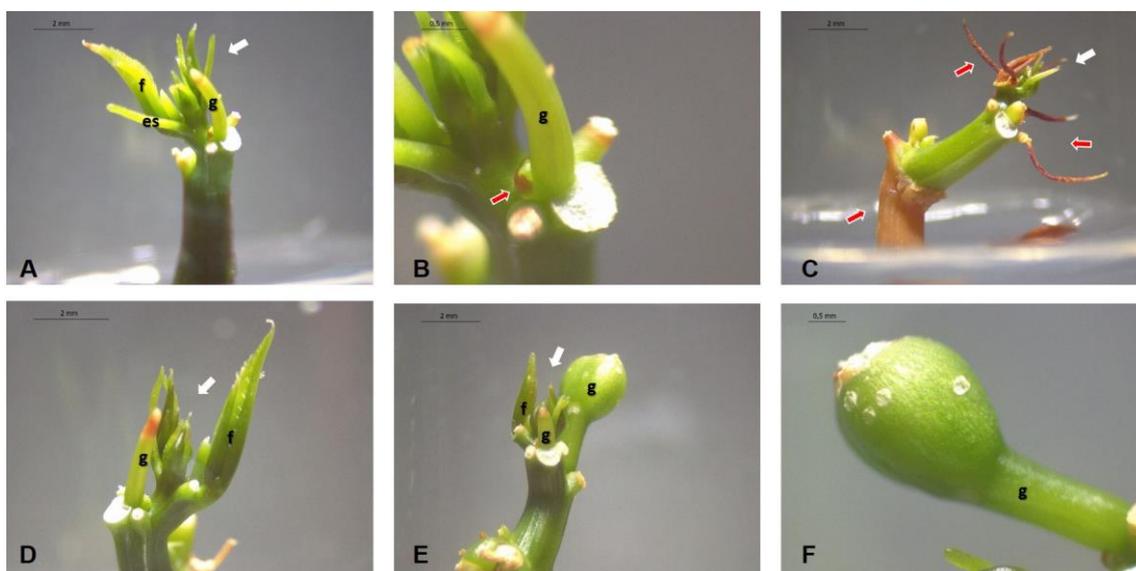


### Tratamento T6 (GA<sub>3</sub> 10μM)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 23A). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

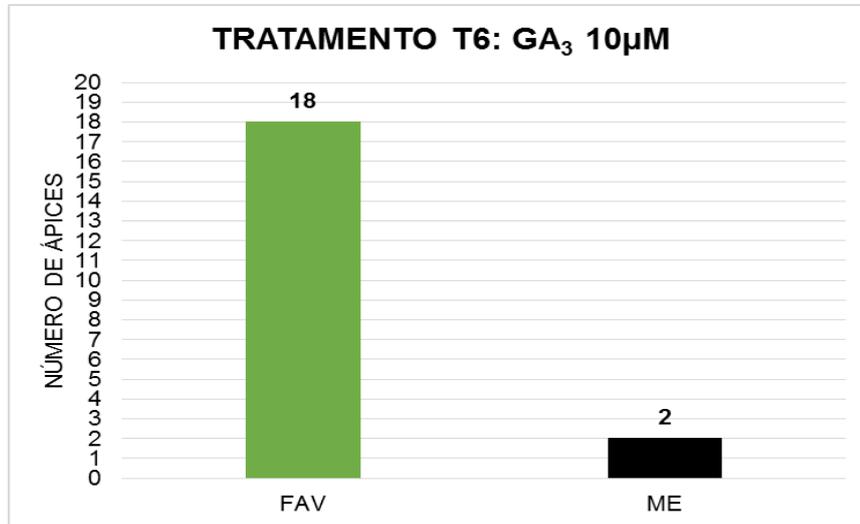
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 23B, C).

Figura 23 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com GA<sub>3</sub> 10μM (tratamento T6). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas, folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Abortamento de botões florais (seta vermelha); C. Oxidação de tecido na base do explante e abortamento de fitômeros periféricos (setas vermelhas). Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas, folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; D. Manutenção de fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; E. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas, folhas trilobadas); F. Gavinha com terminação globular. Legenda: es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, C, D, E, F = 2mm; B = 0,5mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Dezoito amostras (tubos 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,18,19,20) foram caracterizadas como na fase adulta-vegetativa, e nenhuma amostra, como na fase adulta-reprodutiva (Figura 24).

Figura 24 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e GA<sub>3</sub> 10µM em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: FAV = Fase adulta vegetativa; ME = Morte do explante.

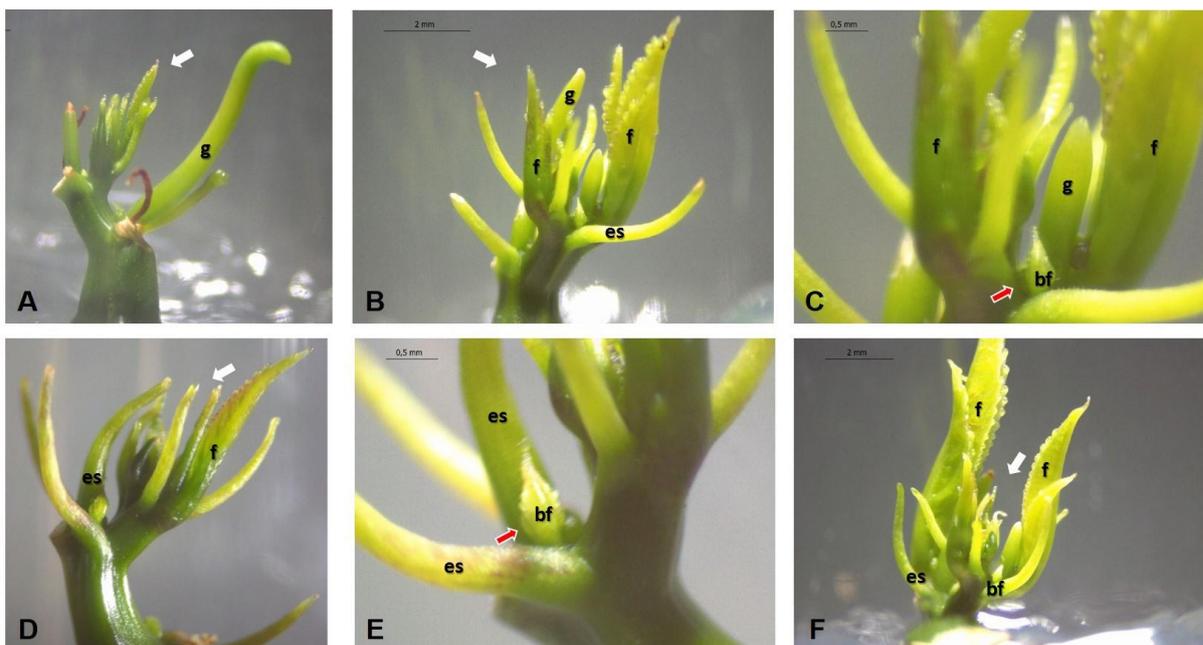


### Tratamento T7 (NPA 1µM)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 25A, B, D). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações (Figura 25C, E, F). Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio.

Figura 25 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com NPA 1 $\mu$ M (tratamento T7). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas, folhas trilobadas). Crescimento e manutenção de gavinhas. Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas, folhas trilobadas). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; C. Botão floral localizado ao lado da gavinha (seta vermelha); D. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas, folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; E. Ampliação da imagem D, evidenciando o botão floral (seta vermelha); F. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas, folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, B, F = 2mm; C, E = 0,5mm; D = 1mm.



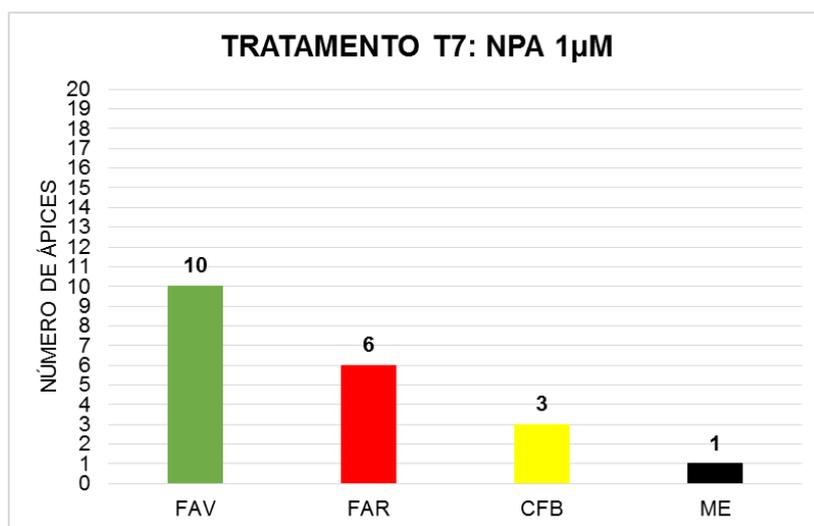
Da mesma forma, os explantes cultivados em meio de cultura com NPA (tratamentos T7 e T8) não apresentaram formação de brotos. De acordo com Feng e Linck (1970), o NPA inibiu o crescimento de calos em tabaco, mas promoveu a formação de brotos. Vidal et al. (2003) relatam que o NPA inibiu a formação e o crescimento das raízes em culturas de ramos de carvalho.

Hu et al. (2017) observaram que o NPA favoreceu a formação de brotos das cultivares de citrus híbrido Carrizo e limão Eureka, quando associado à citocinina. O efeito promotor do NPA na organogênese de brotos é dependente da ação da citocinina.

Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Dez amostras (tubos 1,2,4,5,7,9,10,13,14,20) foram caracterizadas como

na fase adulta vegetativa, e seis amostras (3,6,11,15,16,18) como na fase adulta reprodutiva (Figura 26).

Figura 26 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e NPA 1 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

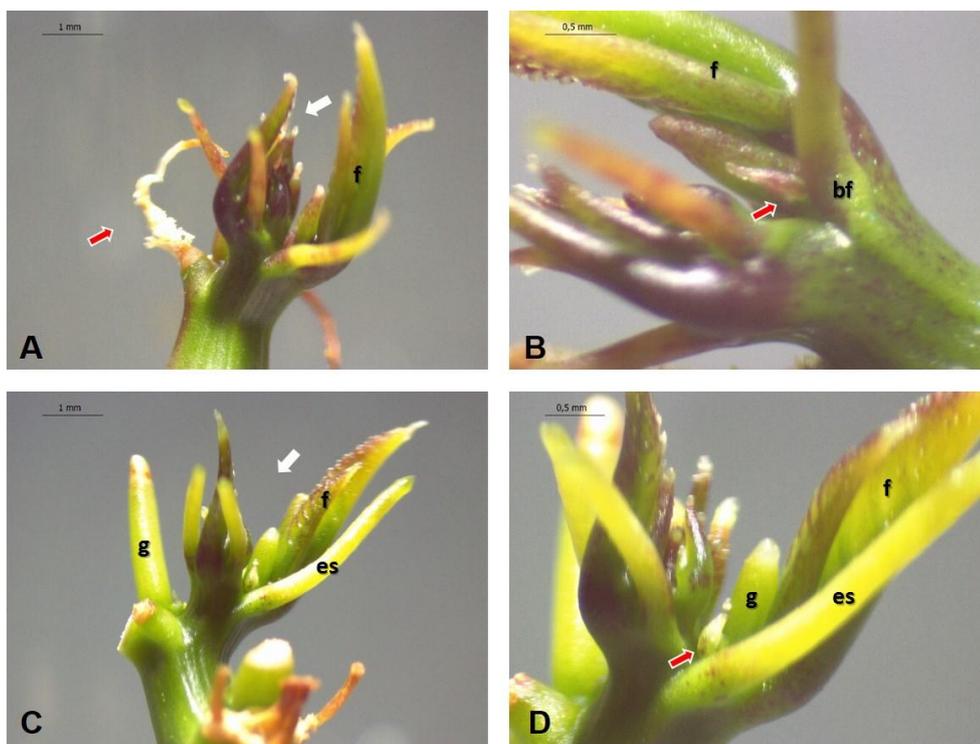


### Tratamento T8 (NPA 10 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 27A, C). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações (Figura 27B, D). Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

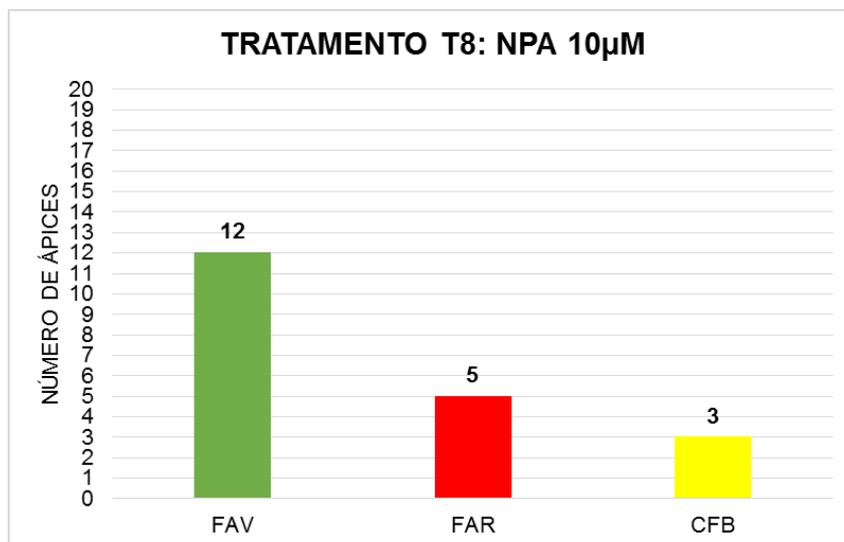
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 27A).

Figura 27 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com NPA 10 $\mu$ M (tratamento T8). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca); Abortamento dos fitômeros periféricos (seta vermelha). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Botão floral localizado ao lado da gavinha (seta vermelha); C. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. D. Botão floral localizado ao lado da gavinha (seta vermelha). Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, C = 1mm; B, D = 0,5mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Doze amostras (tubos 1,3,5,7,8,11,14,15,17,18,19,20) foram caracterizadas como na fase adulta vegetativa, e seis amostras (9,10,12,13,16) como na fase adulta reprodutiva (Figura 28).

Figura 28 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e NPA 10 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva.

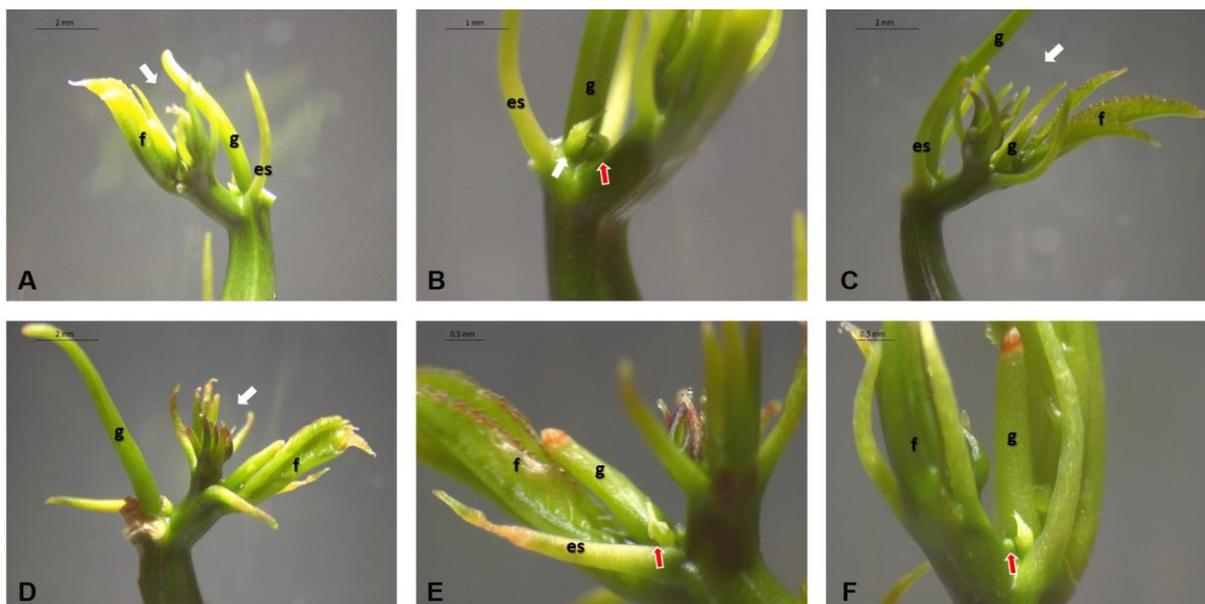


### Tratamento T9 (PACLO 1 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 29 A, C, D). Em alguns ápices caulinares, foi observada a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações (Figura 29 B, E). Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio.

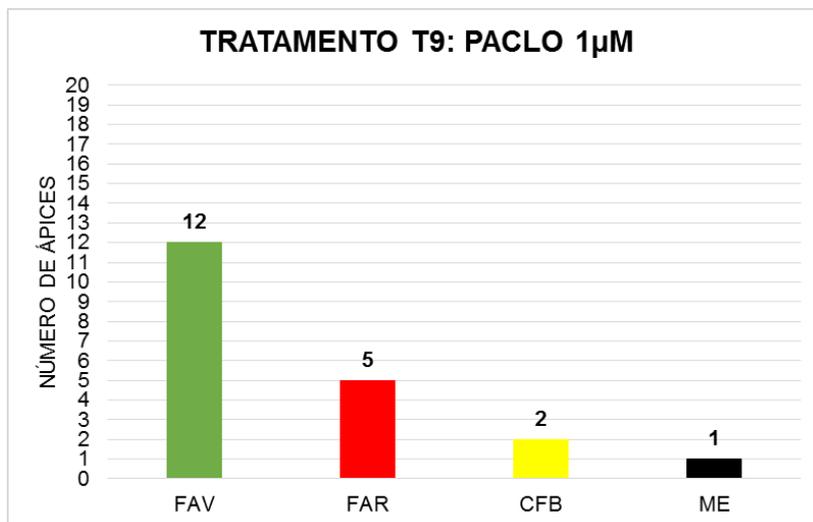
Figura 29 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com PACLO 1 $\mu$ M (tratamento T9). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; B. Botão floral (seta branca) e gema axilar (seta vermelha) localizados próximos a gavinha; C. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; D. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; E. Botão floral (seta vermelha); F. Gema axilar (seta vermelha). Legenda: bf = botão floral, es = estípula, f = folha trilobada, g = gavinha, ga = gema axilar. Barras: A, C, D = 2mm; B= 1mm; E, F = 0,5mm.



Os explantes cultivados em meios de cultura com adição de Paclobutrazol (tratamentos T9 e T10) não apresentaram desenvolvimento de brotos. Segundo Hamama et al., (2012), os tratamentos PBZ produzem calos, além de favorecer a taxa de formação dos mesmos, melhorando a taxa de regeneração, como foi visto em espécies de *Pelargonium*. Todavia, os tratamentos com PBZ não tiveram efeito sobre a formação direta de brotos, raízes ou embriogênese direta.

Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Doze amostras (tubos 1,2,3,4,5,9,10,11,13,14,18,20) foram caracterizadas como na fase adulta vegetativa, e cinco amostras (8,15,16,17,19) como na fase adulta reprodutiva (Figura 30).

Figura 30 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e PACLO 1 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

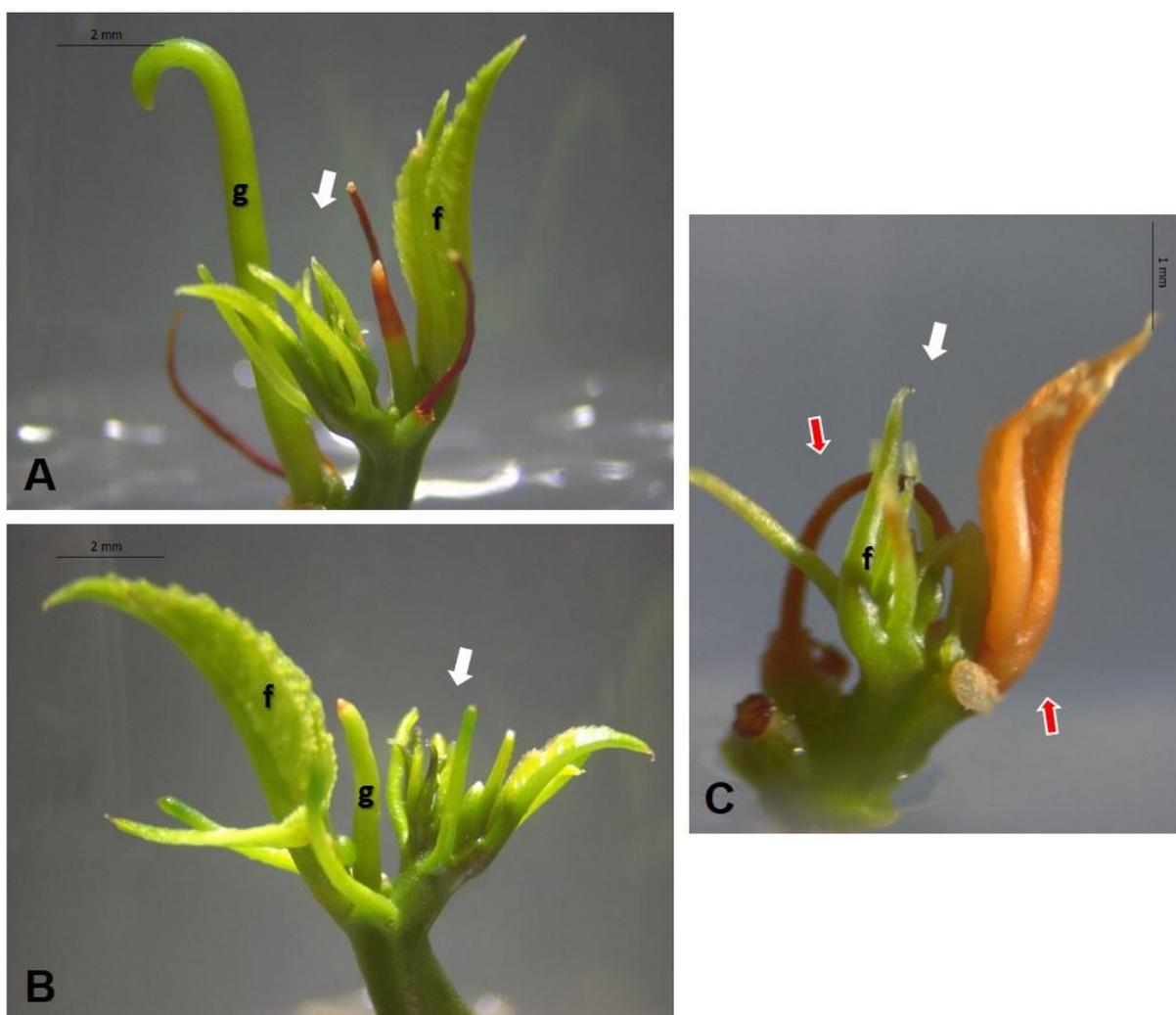


### Tratamento T10 (PACLO 10 $\mu$ M)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 31A). Em alguns ápices caulinares, foi observado a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações. Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

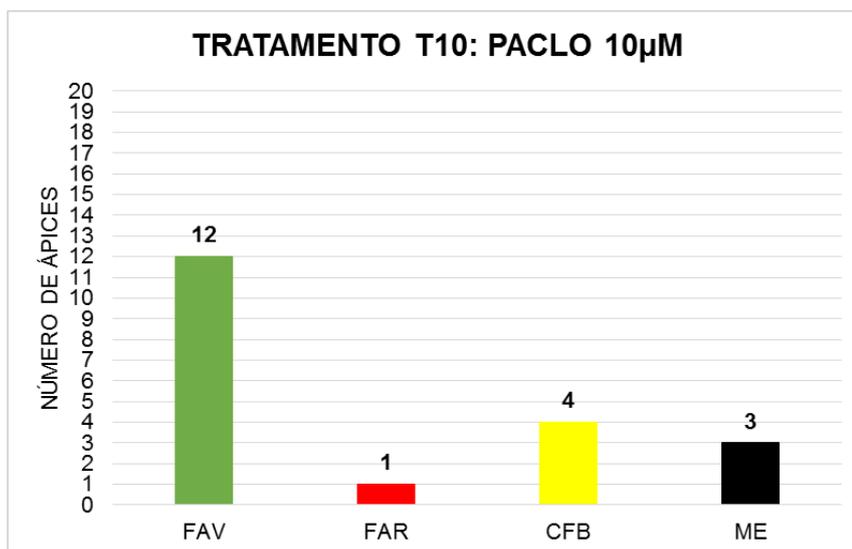
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio (Figura 31 C).

Figura 31 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM com PACLO 10 $\mu$ M (tratamento T10). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; C. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas) (seta branca). Abortamento de fitômeros periféricos (setas vermelhas). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva. Legenda: f = folha trilobada, g = gavinha. Barras: A, B = 2mm; C = 1mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Doze amostras (tubos 1,3,5,6,8,9,11,12,13,18,19,20) foram caracterizadas como na fase adulta vegetativa, e uma amostra (17) como na fase adulta reprodutiva (Figura 32).

Figura 32 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM e PACLO 10 $\mu$ M em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva; ME = Morte do explante.

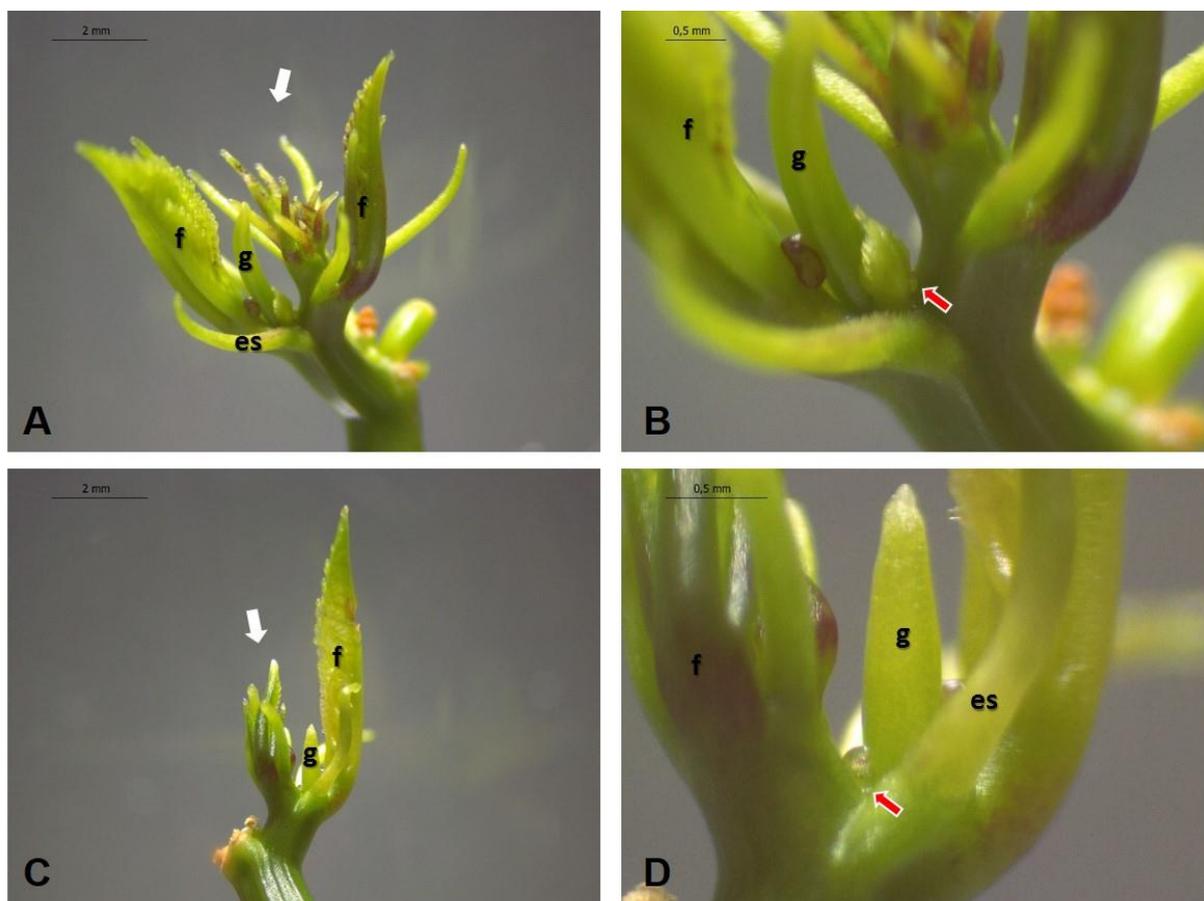


### Tratamento T11 (CONTROLE)

Os fitômeros centrais, ou seja, mais próximos do MAC são preservados ou mantidos, entretanto, não houve desenvolvimento desses órgãos (folhas trilobadas, gavinhas, estípulas e gemas axilares) (Figura 33A). Em alguns ápices caulinares, foi observada a presença e manutenção de botões florais ao longo das avaliações (Figura 33B). Infere-se que estes iniciaram seu desenvolvimento ainda em campo, antes do momento de coleta. De alguma forma, o meio de cultura apresentou resposta favorável à manutenção desses órgãos reprodutivos em alguns ápices caulinares.

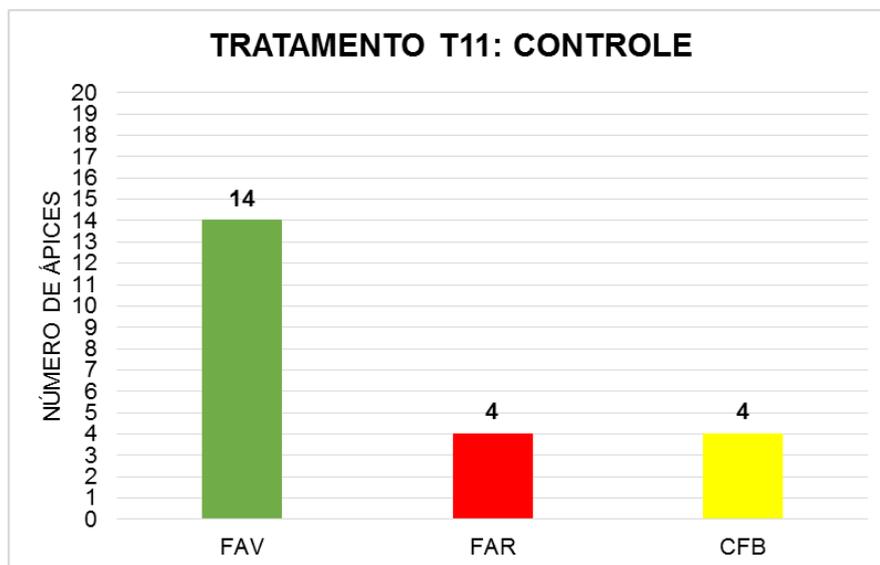
Observou-se que os fitômeros mais periféricos, ou seja, mais distantes do MAC, frequentemente, eram abortados, em que os órgãos vegetativos e reprodutivos apresentavam características de senescência foliar ou morte, caracterizado pela queda de folhas, gavinhas, estípulas e até botões florais no interior dos tubos de ensaio.

Figura 33 - Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM (tratamento T11 - controle). A. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, estípulas e folhas trilobadas). Ápice caulinar na fase adulta vegetativa; B. Botão floral flanqueando a gavinha (seta vermelha); C. Manutenção dos fitômeros próximos ao MAC (gavinhas, gemas axilares, botões florais, estípulas e folhas trilobadas). Ápice caulinar na fase adulta reprodutiva; D. Gema axilar localizada em frente à gavinha. Barras: A, C = 2mm; B, D = 0,5mm.



Os ápices caulinares foram avaliados e caracterizados conforme a sua fase de desenvolvimento, exceto as amostras em que ocorreu contaminação ou morte do explante. Catorze amostras (tubos 2,4,5,7,10,11,12,13,14,15,16,18,19,20) foram caracterizadas como na fase adulta vegetativa, e quatro amostras (1,3,8,17) como na fase adulta reprodutiva (Figura 34).

Figura 34 – Ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MSM (controle) em diferentes fases de desenvolvimento. Legenda: CFB = Contaminação fúngica ou bacteriana; FAV = Fase adulta vegetativa; FAR = Fase adulta reprodutiva.



O cultivo de ápices caulinares adultos em meio MSM com reguladores de crescimento não favoreceu ou facilitou a reversão à juvenilidade de ápices caulinares adultos de *P. edulis*. As respostas dos ápices aos reguladores foi pouca ou nenhuma quanto aos aspectos de rejuvenescimento *in vitro*.

Conforme Drew (1991), o cultivo *in vitro* de tecidos adultos das espécies de *Passiflora* é difícil e não respondeu aos meios de culturas com baixas concentrações de reguladores de crescimento (quando menores que 10 $\mu$ M), como descrito neste trabalho.

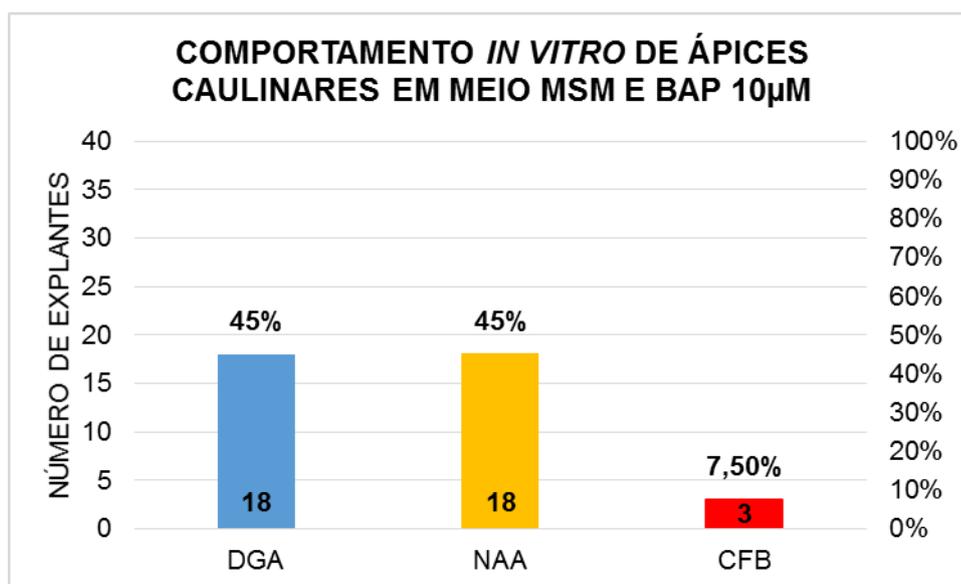
Todavia, o uso da citocinina BAP na concentração de 10  $\mu$ M teve influência na reversão dos ápices caulinares adultos de *P. edulis* neste trabalho. Aplicações de citocininas podem causar um estímulo do crescimento e reversão às características juvenis em muitas espécies (GONÇALVES, 1982; HARTMANN et al., 1997; HUANG et al., 1990).

### 5.1.6. Cultivo de ápices caulinares em meio MSM com BAP na concentração de 10 $\mu$ M

Após a observação do comportamento dos ápices caulinares cultivados sob meio de cultura MSM com reguladores de crescimento, constatou-se uma resposta importante destes quando cultivados em meio MSM suplementados com BAP na concentração de 10  $\mu$ M (Tratamento T4). Dessa forma, realizou-se um pequeno experimento com as mesmas condições e número maior de explantes para observar as respostas dos ápices caulinares. Na Figura 35, pode-se observar o comportamento de resposta dos ápices caulinares cultivados no meio de cultura adicionado com a citocinina.

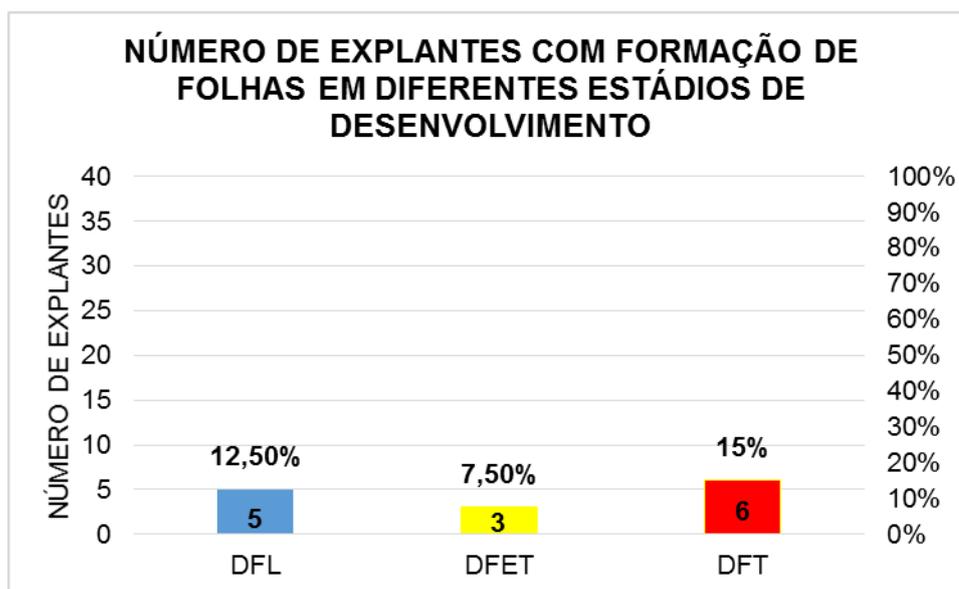
A formação de novos brotos a partir das gemas axilares presentes nos ápices caulinares deu-se em 45% do experimento (Figura 35 e 37). Este processo dá-se devido ao papel da citocinina BAP, responsável por novas divisões celulares e formação de novas estruturas.

Figura 35 - Respostas de ápices caulinares de plantas adultas cultivados em meio MSM + BAP 10  $\mu$ M. Legenda: CFB: Contaminação fúngica ou bacteriana; DGA: Desenvolvimento de gema adventícia, NAA: Nenhuma alteração aparente.



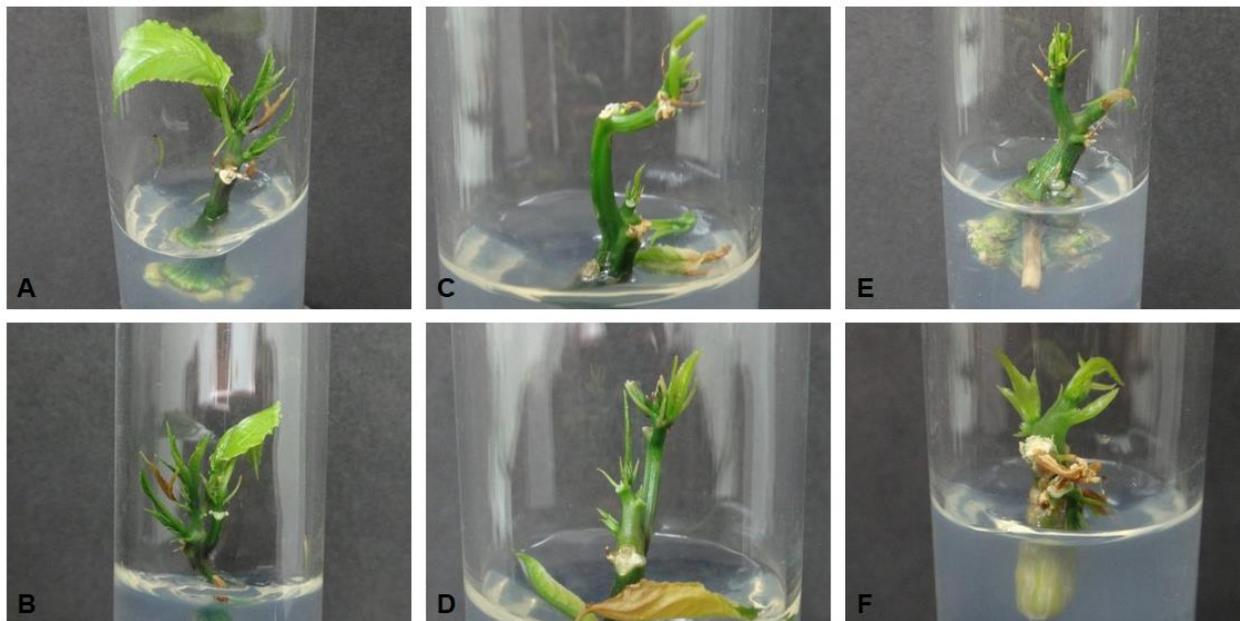
Observou-se também a formação de calos e oxidação nas bases de alguns explantes e baixa contaminação (7,5%) (Figura 35). Além da formação de novos brotos, houve a formação e desenvolvimento de folhas lanceoladas *in vitro* (12,5%), além do desenvolvimento das folhas trilobadas (15%) (Figura 36).

Figura 36 - Desenvolvimento de folhas *in vitro* a partir de ápices caulinares de *Passiflora edulis* cultivados em meio de cultura MSM com adição de 10 $\mu$ M BAP. Legenda: DFL: Desenvolvimento de folhas lanceoladas; DFET: Desenvolvimento de folhas em transição; DFT: Desenvolvimento de folhas trilobadas.



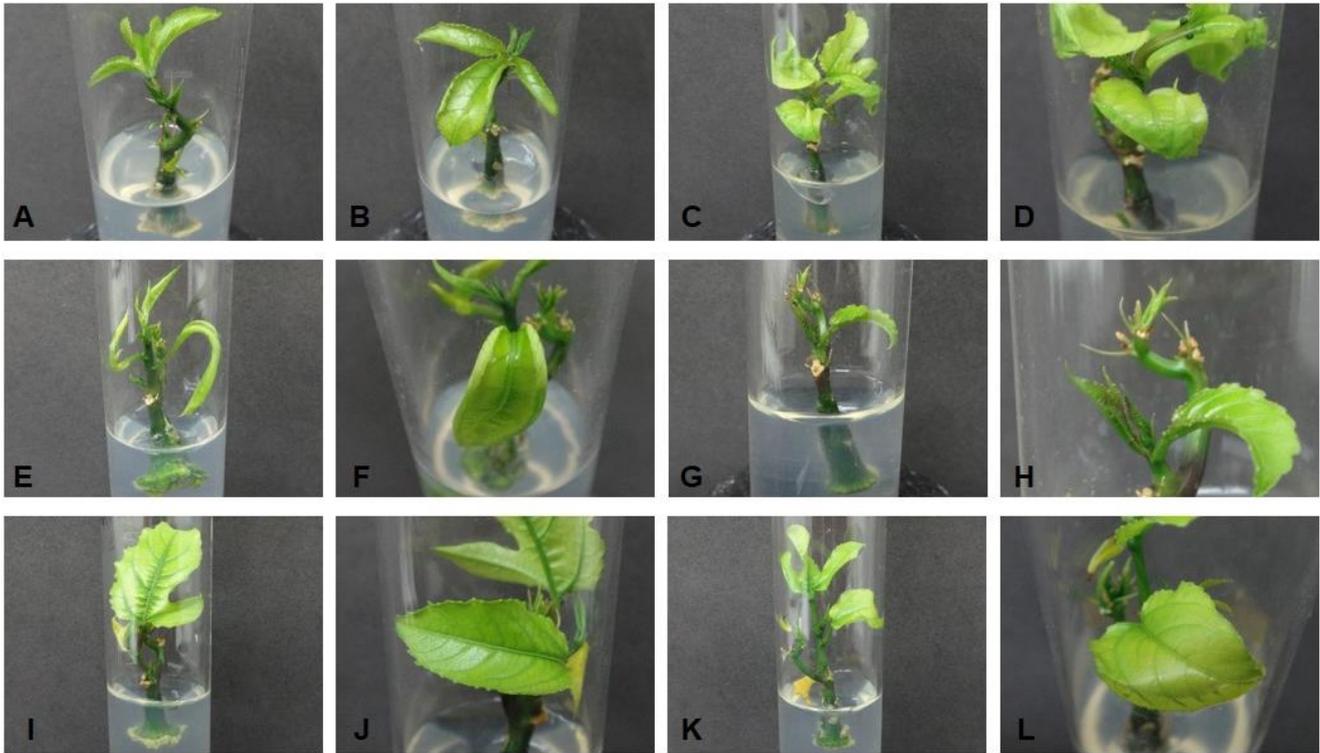
A ocorrência de folhas lanceoladas *in vitro*, a partir de ápices caulinares de plantas adultas, pode caracterizar a ocorrência da reversão à juvenilidade em ápices caulinares de *P. edulis*, quando cultivados em meio de cultura MSM com adição de 10  $\mu$ M BAP (Figura 37).

Figura 37 - Desenvolvimento de brotos *in vitro* a partir de gemas axilares em ápices caulinares de *Passiflora edulis*. A-B. Formação de brotos, desenvolvimento de calos na base do explante e manutenção de folhas em transição de fase; C-D. Formação de brotos e senescência foliar; E. Formação de brotos, oxidação e desenvolvimento de calos da base do explante; F. Formação de brotos e oxidação da base do explante.



Neste trabalho, dentre os 40 ápices caulinares cultivados em meio MSM e 10 micromolar de BAP, 18 ápices tiveram o desenvolvimento das gemas axilares. Essas gemas produziram brotos com folhas lanceoladas, trilobadas e folhas em transição (Figura 38).

Figura 38 - Desenvolvimento de folhas trilobadas e folhas lanceoladas *in vitro* a partir de gemas axilares em ápices caulinares de plantas adultas de *Passiflora edulis* em meio MSM com BAP 10 $\mu$ M. A-B. Desenvolvimento de folha trilobadas, formação de brotos e desenvolvimento de calos na base do explante; C, D, E, F, G, H, K e L. Desenvolvimento de folhas trilobadas, folhas lanceoladas e formação de brotos; I-J. Desenvolvimento de folha em transição, folhas lanceoladas e formação de brotos.



A formação de folhas de forma adventícia *in vitro* geralmente denota a presença de um meristema desenvolvidor de brotos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a). Kawata et al. (1995) relatam a ocorrência da reversão *in vitro* de *P. edulis* quando ápices caulinares adultos foram cultivados em meio MS e contendo 10  $\mu$ M de BAP, com formação múltipla de brotos e desenvolvimento de folhas lanceoladas, caracterizando o rejuvenescimento *in vitro* através destes marcadores morfológicos induzidos a partir da micropropagação.

Ápices caulinares de maçã cultivados *in vitro* também mostraram alguma reversão na forma das folhas sob o sistema de cultura de tecidos. Essa reversão é manifestada por folhas lobadas, serrilhas irregulares e profundas, além de lâminas de folhas mais finas do que as normalmente encontradas nas folhas de sombra (SRISKANDARAJAH; MULLINS; NAIR, 1982; ZIMMERMAN, 1981).

Mullins, Nair e Sampet (1979) relataram que a forma juvenil de “Cabernet Sauvignon”, um antigo clone de uva, reapareceu *in vitro* em ápices caulinares maduros subcultivados em série. A juvenilidade foi indicada pela falta de gavinhas e pela filotaxia espiralada, ambas características juvenis da uva.

Observou-se também que os explantes cultivados em meio MSM e BAP 10  $\mu$ M apresentaram o desenvolvimento de brotos adventícios (Figura 19). A formação de brotos adventícios é denominada caulogênese, que pode ser descrita como a indução da formação de um novo padrão de crescimento de brotos em tecidos de plantas sem meristemas preexistentes (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a). Segundo Bonga (1982), as brotações adventícias são juvenis. Isso significaria que o processo de formação de brotos adventícios pode ter um efeito rejuvenescedor.

O uso de citocininas em protocolos de organogênese *in vitro* em espécies de Passiflora foi relatado com indução de gemas adventícias em resposta ao BAP sozinho ou em associação com ANA, TDZ ou cinetina (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; DORNELAS; CARNEIRO VIEIRA, 1994; TREVISAN; MENDES, 2005).

Biasi et al. (2000) relatam que a exposição de segmentos internodais de maracujá amarelo ao meio de cultura e as concentrações de 1 a 2 mg/L de BAP foi eficiente para a formação de gemas adventícias observadas em ambas as extremidades basal e apical do explante. Tal resultado pode ter sido causado pelo efeito residual do BAP que pode promover grande número de brotos por explante em detrimento ao alongamento dos mesmos. Em vários casos, o BAP pode induzir a formação de gemas adventícias, muitas vezes levando ao verdadeiro rejuvenescimento (BONGA; VON ADERKAS, 1993).

Na cultivar de uva Vugava, o subcultivo sucessivo dos segmentos nodais adultos estimulou o desenvolvimento das gemas axilares com formação de caracteres juvenis semelhantes aos encontrados nas plântulas, tais como a filotaxia em espiral, uma vez que a filotaxia que caracteriza a fase adulta é do tipo distica, além da diminuição do número de gavinhas desenvolvidas *in vitro* e desaparecimento dos brotos na cultura ao longo dos subcultivos (HARTL-MUSINOV; KATARINA; BUĆAN, 2005).

Muitos autores relatam que o rejuvenescimento *in vitro* ocorre quando as culturas são subcultivadas repetidamente. Gupta et al (1981) e Díaz-Sala et al (1990) não tiveram êxito em seus trabalhos com micropropagação de espécies

arbóreas nos primeiros subcultivos, quando repetidos de 3 a 4 vezes. Contudo, quando foram realizados novos subcultivos, os brotos propagados enraizaram-se facilmente. Eles assumem que quando os tecidos da planta adulta passam por vários subcultivos em cultura de tecidos, o comportamento dos tecidos é semelhante aos tecidos de plântulas. Em alguns casos, o rejuvenescimento pode ocorrer no cultivo inicial; em outros, vários subcultivos podem ser necessários (READ; BAVOUGIAN, 2013).

Neste trabalho, os explantes de ápices caulinares adultos de *P. edulis* cultivados em meio de cultura MSM com adição de 10 µM de BAP apresentaram desenvolvimento de estruturas que conferem um processo de reversão, mesmo sendo uma reversão parcial, ou seja, algumas características puderam ser revertidas para uma fase de desenvolvimento anterior, em dois subcultivos somente.

Deve-se considerar que a mudança de fase de juvenil para adulta é gradual e, portanto, a reversão também será gradual, o que significa que algumas técnicas podem causar apenas um rejuvenescimento parcial (MEIER-DINKEL; KLEINSCHMIT, 1990).

Como o rejuvenescimento *in vitro* é um processo muito difícil de caracterizar e, na ausência de outras características (ou seja, mudanças foliares), o aumento do potencial de enraizamento pode ser considerado, por si só, como uma característica do rejuvenescimento, particularmente em plantas lenhosas (FEIJÓ; PAIS, 1990).

Brand e Lineberger (1992) relatam que o rejuvenescimento da bétula parece ocorrer durante a micropropagação *in vitro*, mas o nível de juvenilidade que é recuperado pode não ser equivalente ao de uma plântula. Nem todos os indicadores morfológicos de mudança de fase são afetados igualmente pelo rejuvenescimento *in vitro*.

Em geral, algumas características relacionadas à maturação mostram-se mais fáceis de serem revertidas do que outras e os respectivos tratamentos para promoção do rejuvenescimento influenciam de forma diferenciada essas características, o que leva à conclusão de que o rejuvenescimento ocorre em termos relativos e não absolutos (HACKETT; MURRAY, 1993) sendo possível recuperar pelo menos parte da juvenilidade perdida e potencial capacidade morfogênica de tecidos maduros pela cultura de tecidos (ZOBEL; TALBERT, 1984).

A micropropagação traz uma reversão gradual para a condição juvenil. O rejuvenescimento resultaria de condições que favorecessem uma multiplicação mais rápida das células juvenis, o que explicaria o rejuvenescimento gradual descrito por (HUANG et al., 1992) e (GREENWOOD, 1987). De acordo com Read e Bavougian (2013), a cultura *in vitro* tem impacto significativo na mudança de fase e, especificamente, no rejuvenescimento. A micropropagação de explantes obtidos a partir de tecidos vegetais maduros causa essencialmente o rejuvenescimento, levando à formação de microplantas que apresentam uma ou mais características juvenis.

Neste trabalho apresentou-se informações importantes a respeito da caracterização morfológica das fases de desenvolvimento de *P. edulis* e descrição sobre o rejuvenescimento *in vitro* parcial alcançado, através de dois subcultivos de ápices caulinares adultos de *P. edulis* cultivados em meio MSM contendo 10 µM de BAP.

Os ápices caulinares foram utilizados devido a grande vantagem desse tipo de explante ser constituído por órgãos meristemáticos pré-formados, que são mais sujeitos ao rejuvenescimento devido a sua plasticidade, segundo Franclet (1979). Contudo, ainda demanda estudos, uma vez que, alguns trabalhos têm relatado a dificuldade de regeneração de plantas de espécies do gênero *Passiflora* a partir de tecidos adultos (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; BIRICOLTI; CHIARI, 1994).

Devido a carência de informações específicas sobre o caráter bioquímico, fisiológico e genético do rejuvenescimento *in vitro* de *P. edulis*, não foi possível determinar o grau de juvenilidade do material vegetal revertido no presente trabalho. Uma melhor compreensão da base molecular das diferenças entre a fase juvenil e a fase adulta pode permitir uma caracterização mais adequada do fenômeno de reversão à juvenilidade.

## 6. CONCLUSÕES

A hipótese inicial que previa a reprogramação dos produtos dos meristemas axilares a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares adultos de *P. edulis* em meio MS ou MSM em ausência de reguladores de crescimento foi refutada, não se observando continuidade no desenvolvimento dos ápices caulinares em ausência de regulador de crescimento. No entanto, ápices caulinares cultivados em meio MSM e adição de citocinina BAP demonstraram reversão à juvenilidade.

O rejuvenescimento de ápices caulinares adultos cultivados *in vitro* de *P. edulis* foi obtido a partir de cultivo em meio MSM com adição de 10 $\mu$ M de BAP. Entretanto, o rejuvenescimento é parcial, pois nem todas as características foram revertidas.

A formação de folhas lanceoladas *in vitro* e o desenvolvimento de gemas adventícias caracterizaram a reversão à juvenilidade em *P. edulis* em meio MSM suplementado com 10 micromolar de BAP.

## REFERÊNCIAS

- AIZZA, L. C. B.; DORNELAS, M. C. A Genomic Approach to Study Anthocyanin Synthesis and Flower Pigmentation in Passionflowers. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2011, p. 1–17, 2011.
- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. **Hawaii Agricultural Experiment Station**, n. 39, p. 45, 1959.
- ALBANI, M. C.; COUPLAND, G. Comparative analysis of flowering in annual and perennial plants. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 91, n. C, p. 323–348, 2010.
- ALLSOPP, A. Heteroblastic Development in Vascular Plants. In: ABERCROMBIE, M.; BRACHET, J. (Eds.). **Advances in Morphogenesis**. Advances in Morphogenesis. [s.l.] Elsevier, 1967. v. 6p. 127–171.
- ALMEIDA LIMA, A.; CUNHA, M. P. Exigências edafoclimáticas. In: **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas,BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 37–44.
- ANDREU, P.; MARÍN, J. A. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 2, p. 258–267, 2005.
- BALLESTER, A. et al. Development of Rejuvenation Methods for *in Vitro* Establishment, Multiplication and Rooting of Mature Trees BT - Plant Aging: Basic and Applied Approaches. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Plant Aging: Basic and Applied Approaches**. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 43–49.
- BARTON, M. K. Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 95–113, 2010.
- BATTEY, N. H.; LYNDON, R. F. Apical Growth and Modification of the Development of Primordia During Re-flowering of Reverted Plants of *Impatiens balsamina* L. **Annals of Botany**, v. 58, n. 3, p. 333–341, 1986.
- BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and Physiological Condition of Donor Plants Affect *in vitro* Morphogenesis in Leaf Explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 1, p. 87–90, 2004.
- BENNETT, T.; LEYSER, O. Something on the side: Axillary meristems and plant development. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 6 SPEC. ISS., p. 843–854, 2006.

BERNACCI, L. C. . et al. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 566–576, 2008.

BEYL, C. A. PGRs and Their Use in Micropropagation. In: TRIGIANO, R. .; GRAY, D. . (Eds.). . **Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology**. [s.l.] CRC Press, 2011. p. 33–56.

BIASI, L. A. et al. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 661–665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, p. 171–175, 1994.

BONGA, J. M. Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturity, and Rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1982. p. 387–412.

BONGA, J. M.; ADERKAS, P. VON. **In Vitro Culture of Trees**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. Rejuvenation of Tissues from Mature Conifers and its Implications for Propagation *in Vitro*. In: AHUJA, M.-R.; LIBBY, W. J. (Eds.). . **Clonal Forestry I: Genetics and Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993. p. 182–199.

BORCHERT, R. Gibberellic acid and rejuvenation of apical meristems in *Acacia melanoxylon*. **Naturwissenschaften**, v. 52, n. 3, p. 65–66, mar. 1965.

BRAND, M. H.; LINEBERGER, R. D. *In Vitro* Rejuvenation of *Betula* (Betulaceae): Morphological Evaluation. **American Journal of Botany**, v. 79, n. 6, p. 618–625, 1992.

BRUINSMA, J. **SESSION I - BASIC SUBJECTS - HORMONAL ASPECTS OF FRUIT PRODUCTION**. Acta Horticulturae. **Anais...**Leuven: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 1 dez. 1973.

BUBAN, T.; FAUST, M. **Flower Bud Induction in Apple Trees: Internal Control and Differentiation Horticultural Reviews**: Wiley Online Books., 1 jan. 1982.

CALONJE, M. et al. Floral Meristem Identity Genes Are Expressed during Tendril Development in Grapevine. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1491–1501, 2004.

CAÑIZARES CHACÍN, A. E.; JARAMILLO AGUILAR, E. E. **El cultivo de la Maracuyá en Ecuador**. Machala- ed. [s.l.] Machala, 2015.

COOPER, W. C.; PEYNADO, A. Effect of gibberellic acid on growth and dormancy in citrus. **Proceedings. American Society for Horticultural Science.**, v. 72, p. 284–289, 1958.

CRANE, J. C.; PRIMER, P. E.; CAMPBELL, R. C. Gibberellin induced parthenocarpy in *Prunus*. **Proceedings. American Society for Horticultural Science**, v. 75, p. 129–137, 1960.

CUTRI, L. et al. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of Development**, v. 130, n. 1, p. 61–69, jan. 2013.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** 3rd edition. Kluwer Academic, 2004.

DE ZEEUW, D.; LEOPOLD, A. C. Altering Juvenility with Auxin. **Science**, v. 122, n. 3176, p. 925 LP-926, 11 nov. 1955.

DÍAZ-SALA, C.; REY, M.; RODRÍGUEZ, R. Recovery of Transient Juvenile Capacities During Micropropagation of Filbert. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Plant Aging: Basic and Applied Approaches**. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 27–36.

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

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, n. 1, p. 23–27, 1991.

EVANS, M. M. S.; POETHIG, R. S. Gibberellins Promote Vegetative Phase Change and Reproductive Maturity in Maize. **Plant Physiology**, v. 108, n. 2, p. 475–487, 1995.

FEIJÓ, J. A.; PAIS, M. S. S. Rejuvenation of Adult Specimens of *Castanea sativa* Mill: Through *In Vitro* Micropropagation. In: **Plant Aging**. [s.l.] Springer, 1990. p. 383–387.

FENG, K. U. O. A. O.; LINCK, A. J. Effects of N-1-naphthylphthalamic acid on the growth and bud formation of tobacco callus grown *in vitro*. **Plant and Cell Physiology**, v. 11, n. 4, p. 589–598, 1 ago. 1970.

FRANCLET, A. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation vegetative. **Etudes et Recherches**, v. 12, p. 3–18, 1979.

FRIML, J. Auxin transport - shaping the plant. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 7–12, fev. 2003.

FRYDMAN, V. M.; WAREING, P. F. Phase Change in *Hedera helix* L.: I. GIBBERELLIN-LIKE SUBSTANCES IN THE TWO GROWTH PHASES. **Journal of Experimental Botany**, v. 24, n. 83, p. 1131–1138, 1973.

GABA, V. P. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: **Plant Development and Biotechnology**. 2004. p. 87–100.

GARCIA, R. et al. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 524, p. 47–54, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE. Adventitious Regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008a. p. 355–401.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors BT - Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd Edition ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008b. p. 175–204.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008c. p. 227–281.

GOLA, E. M. et al. Development of abnormal strobili in *Lycopodium annotinum* as an example of the reversion phenomenon in lower vascular plants. **Botany**, v. 93, n. 10, p. 701–707, 2015.

GOLDSCHMIDT, E. E.; MONSELISE, S. P. Hormonal Control of Flowering in *Citrus* and Some Other Woody Perennials. In: **Plant Growth Substances**. 1972. p. 758–766.

GONÇALVES, A. N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*. S. T. in vitro**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, 1982.

GOODIN, J. R.; STOUTEMYER, V. T. Effect of Temperature and Potassium Gibberellate on Phases of Growth of Algerian Ivy. **Nature**, v. 192, p. 677, 18 nov. 1961.

GOURLAY, C. W.; HOFER, J. M. I.; ELLIS, T. H. N. Pea Compound Leaf Architecture Is Regulated by Interactions among the Genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESS*. **The Plant Cell**, v. 12, n. 8, p. 1279–1294, 2000.

GREENWOOD, M. S. Rejuvenation of forest trees. **Plant Growth Regulators**, v. 6, p. 1–12, 1987.

GRIGGS, W. H.; IWAKIRI, B. T. Effects of gibberellin and 2,4,5-trichlorophenoxypropionic acid sprays on Bartlett pear trees. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 77, p. 73–89, 1961.

GUPTA, P.; MASCARENHAS, A. F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees-clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, v. 20, p. 195–201, 31 jan. 1981.

HACKETT, W. P. Juvenility, Maturation, and Rejuvenation in Woody Plants. In: **Horticultural Reviews**. Wiley Online Books. 1985.

HACKETT, W. P.; MURRAY, J. R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of Woody Plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 93–105.

HAMAMA, L. et al. **EFFECT OF GA3 AND PACLOBUTRAZOL ON ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION OF TWO *PELARGONIUM* SP.** Acta Horticulturae. **Anais**...International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 31 out. 2012.

HANSEN, A. K. et al. Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 138–150, 1 jan. 2006.

HARTL-MUSINOV, D.; KATARINA, H.; BUĆAN, L. Rejuvenation of cv. Vugava grapevine (*Vitis vinifera*) *in vitro*. **Biologia - Section Botany**, v. 60, p. 437–442, 1 jul. 2005.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997.

HU, W. et al. Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. **Horticulture Research**, v. 4, p. 17071, 13 dez. 2017.

HUALA, E.; SUSSEX, I. M. Determination and Cell Interactions in Reproductive Meristems. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1157–1165, 1993.

HUANG, L. C. et al. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: **TORRES, AC; CALDAS, LS Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ. 1990. p. 252–264.

HUANG, L. et al. Rejuvenation of *Sequoia sempivirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. **Plant Physiology**, v. 98, p. 166–173, 1992.

HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 19, p. 4117–4129, out. 2011.

JONES, C. S. An Essay on Juvenility, Phase Change, and Heteroblasty in Seed Plants. **International Journal of Plant Sciences**, v. 160, n.6, p.105 – 111, 1999.

KATZ, E. et al. Promotion of *Globularia sarcophylla* flowering by Uniconazol, an inhibitor of gibberellin biosynthesis. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 423–431, 1 set. 2003.

KAWATA, K. et al. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 281–284, 1995.

KEFELI, V. I.; KALEVITCH, M. V. System of Growth and Development Regulation in the Plant. In: KEFELI, V. I.; KALEVITCH, M. V.; BORSARI, B. (Eds.). . **Natural growth inhibitors and phytormones in plants and environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 1–17.

KERSTETTER, R. A.; POETHIG, R. S. The specification of leaf identity during shoot development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 373–398, 1998.

KROSNICK, S. E.; FREUDENSTEIN, J. V. Monophyly and Floral Character Homology of Old World Passiflora (Subgenus Decaloba: Supersection Disemma). **Systematic Botany**, v. 30, n. 1, p. 139–152, 2005.

LUCKWILL, L. C.; SILVA, J. M. The Effects of Daminozide and Gibberellic Acid on Flower Initiation, Growth and Fruiting of Apple cv Golden Delicious. **Journal of Horticultural Science**, v. 54, n. 3, p. 217–223, 1 jan. 1979.

MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. Y. The Edible Species of Passiflora. **Economic Botany**, v. 24, n. 3, p. 333–343, 1970.

MCSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 353–374, 2005.

MEIER-DINKEL, A.; KLEINSCHMIT, J. Aging in tree species: present knowledge. In: **Plant Aging**. [s.l.] Springer, 1990. p. 51–63.

MEILAN, R. Floral induction in woody angiosperms. **New Forests**, v. 14, n. 3, p. 179–202, 1997.

MELETTI, L. M. M. .; OLIVEIRA, J. C. DE;; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas. Jaboticabal: Funep, 2010.

MONTEIRO, A. C. B. de A., et al. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* sims. f. *flavicarpa* Degener). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, n. 6, p. 527–531, nov. 2000.

MOSHKOV, I. . et al. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE (Eds.). . **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition**. Volume 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 230.

MULLINS, M. G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. Rejuvenation *in vitro*: Induction of Juvenile Characters in an Adult Clone of *Vitis vinifera* L. **Annals of Botany**, v. 44, n. 5, p. 623–627, 1979.

MUSCHNER, V. C. et al. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1036–1043, 2012.

NAVE, N. et al. Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal. **Plant, Cell & Environment**. v. 33, n. 12, p. 2065–2083, dez. 2010.

OLIVEIRA, C. M.; BROWNING, G. Studies on the induction of flowering in juvenile *Prunus avium* L. **Journal of Horticultural Science**, v. 68, n. 5, p. 731–739, 1 jan. 1993.

PEREIRA, M. J. Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae). " **ARQUIPÉLAGO. Ciências Biológicas e Marinhas**, n. 26, p. 63–68, 2009.

PHARIS, R. P.; WEBBER, J. E.; ROSS, S. D. The promotion of flowering in forest trees by gibberellin A47 and cultural treatments: A review of the possible mechanisms. **Forest Ecology and Management**, v. 19, n. 1, p. 65–84, 1987.

PLUMMER, J. A. et al. **THE ROLE OF ENDOGENOUS HORMONES IN SHOOT EMERGENCE AND ABSCISSION IN ALTERNATE BEARING VALENCIA ORANGE TREES**. Acta Horticulturae. **Anais...International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Belgium, 1 jul. 1989.

POETHIG, R. S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 250, n. 4983, p. 923–930, nov. 1990.

POETHIG, R. S. The past, present, and future of vegetative phase change. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 541–544, out. 2010.

READ, P. E.; BAVOUGIAN, C. M. *In Vitro* Rejuvenation of Woody Species. In: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.). . **Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 383–395.

REETZ, E. R. **ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014**. Santa Cruz do Sul, 104 p., 2014.

ROBERTS, A. V et al. **THE EFFECTS OF GROWTH RETARDANTS, HUMIDITY AND LIGHTING AT STAGE III ON STAGE IV OF MICROPROPAGATION IN CHRYSANTHEMUM AND ROSE**. Acta Horticulturae. **Anais...International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Belgium, 1 out. 1992.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525–550, 2009.

ROGLER, C. E.; HACKETT, W. P. Phase Change in *Hedera helix*: Induction of the Mature to Juvenile Phase Change by Gibberellin A3. **Physiologia Plantarum**, v. 34, n. 2, p. 141–147, 1975.

RUMBALL, W. Wood structure in relation to heteroblastism. **Phytomorphology**, v. 13, p. 206–214, 1963.

SCHUCH, M. W. et al. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 814–820, 2008.

SCHWABE, W. W. **APPLIED ASPECTS OF JUVENILITY AND SOME THEORETICAL CONSIDERATIONS**. Acta Horticulturae. **Anais...International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Belgium, 1 maio 1976.

SGAMMA, T. Juvenility. In: THOMAS, B.; MURRAY, B. G.; MURPHY, D. J. B. T.-E. OF A. P. S. (SECOND E. (Eds.). . **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Second Ed ed. Oxford: Academic Press, 2017. p. 437–441.

STADEN, J. VAN; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE (Eds.). . **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition**. 3rd Editio ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 205–226.

SINGER, S. R.; MCDANIEL, C. N. Floral determination in the terminal and axillary buds of *Nicotiana tabacum* L. **Developmental Biology**, v. 118, n. 2, p. 587–592, 1986.

SMITH, E. F. et al. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. **HortScience**, v. 27, n. 2, p. 111–113, 1992.

SMITH, E. F.; ROBERTS, A. V; MOTTLEY, J. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 21, n. 2, p. 133–140, 1990.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 1982.

TEIXEIRA, C. G. . et al. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. ed. [s.l.] ITAL, 1994.

TELFER, A.; BOLLMAN, K. M.; POETHIG, R. S. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 3, p. 645–654, fev. 1997.

TIAN, C.; JIAO, Y. A systems approach to understand shoot branching. **Current Plant Biology**, v. 3–4, p. 13–19, 2015.

TOOKE, F. et al. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 420, p. 2587–2599, 2005.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, p. 346–350, 2005.

TRIPPI, V. S. Aging of Meristems and Morphogenetic Potentialities. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S.; DURZAN, D. J. (Eds.). . **Plant Aging: Basic and Applied Approaches**. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 3–10.

TRIPPI, V. S. Studies on ontogeny and senility in plants. V. Leaf-fall in plants of different age of *Robinia pseudoacacia* and the effect of gibberellic acid on *R. pseudoacacia* and *Morus nigra*. **Phyton**, v. 20, p. 167–171, 1963.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Ilustred ed. [s.l.] Timber Press, 2004.

VIDAL, N. et al. Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. **Tree Physiology**, v. 23, n. 18, p. 1247–1254, dez. 2003.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, v. 20, n. 14, p. 921–928, 2000.

WANG, Y. et al. The Stem Cell Niche in Leaf Axils Is Established by Auxin and Cytokinin in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 5, p. 2055 LP-2067, 2014.

WAREING, P. F. Problems of juvenility and flowering in trees. **Journal of the Linnean Society of London, Botany**, v. 56, n. 366, p. 282–289, 1959.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 473–486, 2014.

WU, X.; MCSTEEN, P. The role of auxin transport during inflorescence development in maize (*Zea mays*, Poaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 11, p. 1745–1755, nov. 2007.

ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation of fruit plants**. Symposium on Growth Regulators in Fruit Production 120. **Anais...**1981.

ZIMMERMAN, R. H.; HACKETT, W. P.; PHARIS, R. P. Hormonal Aspects of Phase Change and Precocious Flowering. In: PHARIS, R. P.; REID, D. M. (Eds.). **Hormonal Regulation of Development III: Role of Environmental Factors**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 79–115.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied Forest Tree Improvement**. [s.l.] Wiley, 1984.

ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty-A Review. **Botanical Review**, v. 77, n. 2, p. 109–151, 2011.