

**SEBASTIÃO CARVALHO VASCONCELOS FILHO**

**Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica  
de calos de murici [*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss]**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para a obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**Viçosa**

**Minas Gerais - BRASIL**

**2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFRV**

T

V331c  
2008

Vasconcelos Filho, Sebastião Carvalho, 1984-  
Caracterização anatômica e histoquímica de folhas,  
calogênese e fitoquímica de calos de murici  
[*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich, ex Juss.] / Sebastião  
Carvalho Vasconcelos Filho. – Viçosa, MG, 2008.  
x, 70f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Byrsonima verbascifolia*. 2. Plantas dos cerrados.  
3. Plantas - Anatomia. 4. Histoquímica. 5. Morfogênese.  
6. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura.  
7. Conservação da diversidade de plantas. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.22

**SEBASTIÃO CARVALHO VASCONCELOS FILHO**

**Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica  
de calos de murici [*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss]**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para a obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**APROVADA: 14 de março de 2008.**

---

Prof<sup>a</sup>. Marília Contin Ventrella  
(Co-orientadora)

---

Prof. Fabiano Guimarães Silva  
(Co-orientador)

---

Prof. Aloisio Xavier

---

Prof<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
Orientador

## **Dedico**

A meus pais,  
Sebastião Carvalho Vasconcelos e Onilda Martins Vasconcelos.

Ao orientador e amigo  
Wagner Campos Otoni

## **Agradecimentos**

A Deus pelo milagre e mistério da vida.

A meus pais por todo o apoio e por terem proporcionado as condições para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa pelo amadurecimento aqui passado e ao programa de Pós-Graduação em Botânica pela oportunidade para a realização do curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À minha irmã Jaqueline, pela amizade e carinho que nos une.

À família do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e alunos vinculados: Ana Cláudia, Daniela, Katryne, Maria Luiza (Malú), Letícia, Lourdes, Silvano, Fabiana, Jaqueline e todos aqueles que passaram nestes anos de convivência e paciência e, em especial, a técnica Elisonete Garcia Lani (Lili) por toda a ajuda e carinho.

À turma de pós-graduação da Botânica, pela agradável convivência: Ana Claudia, Josiane, Rosiane, Leonor, Marina, Cristina, pela amizade, confraternizações e sessões de cinema.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni pela confiança, incentivo, e pelo excelente exemplo de pessoa.

A meus co-orientadores, Professores Fabiano e Marília, pelas sugestões e disponibilidade.

À Prof<sup>a</sup>. Elita por realizar os testes fitoquímicos, sugestões e por abrir novos horizontes.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo auxílio nos trabalhos e pelo companheirismo.

**Muito Obrigado!**

## **Biografia**

SEBASTIÃO CARVALHO VASCONCELOS FILHO, filho de Sebastião Carvalho Vasconcelos e Onilda Martins Vasconcelos, nasceu em 27 de agosto de 1984, na cidade de Rio Verde, estado de Goiás.

Graduou-se em Ciências Biológicas em janeiro de 2006 pela Universidade de Rio Verde. Iniciou o mestrado em Botânica em maio de 2006 na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido sua tese em março de 2008.

## Índice

Resumo .....	vi
Abstract.....	viii
1-Introdução Geral .....	1
1.1- Descrição da espécie.....	2
1.2-Propriedades e aplicações da espécie.....	4
1.3- Cultura de tecidos vegetais.....	4
2- Referências Bibliográficas .....	7

### Capítulo 1

---

#### **Anatomia e histoquímica de folhas provenientes do cultivo *in vivo* e *in vitro* de *Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss (Malpighiaceae).**

1- Resumo.....	11
2-Abstract.....	12
3- Introdução.....	13
4- Material e Métodos.....	15
5- Resultados.....	17
6- Discussão.....	25
7- Referências Bibliográficas.....	30

### Capítulo 2

---

#### **Calogênese e triagem fitoquímica dos calos de *Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss (Malpighiaceae).**

1- Resumo.....	34
2- Abstract.....	35
3- Introdução.....	36
4- Material e Métodos.....	39
4.1-Indução de calos em explantes foliares de murici em função de diferentes concentrações de 2,4D, TDZ ou BAP na presença ou ausência de luz.....	40

4.2-Efeito de diferentes concentrações da citocininas BAP combinado ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na calogênese em explantes foliares em murici.....	40
4.3-Efeito de concentrações das citocininas BAP ou TDZ na calogênese em segmentos radiculares de murici.....	41
4.4-Triagem fitoquímica dos calos provenientes de segmentos radiculares de murici.....	41
5. Resultados e Discussão.....	45
6- Referências Bibliográficas.....	61
<b>Conclusões Gerais.....</b>	<b>70</b>

## RESUMO

VASCONCELOS FILHO, Sebastião Carvalho. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss.)**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Fabiano Guimarães Silva e Marília Contin Ventrella.

O murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich, A. Juss.) pertence à família Malpighiaceae e apresenta ampla distribuição nas regiões do Cerrado brasileiro. Destaca-se pela grande variedade de espécies, elevado valor nutricional e medicinal, podendo ser utilizada na indústria de curtume. Porém, a propagação por meio de sementes do gênero *Byrsonima* esbarra em problemas como baixa taxa de germinação e lenta emergência das plântulas. Um mecanismo eficiente e que poderá contribuir na solução desse problema é a utilização de técnicas de propagação *in vitro*. Todavia, as plantas quando cultivadas *in vitro* crescem em condições diferentes das plantas cultivadas *ex vitro* ou *in vivo* e, freqüentemente, podem apresentar diferenças anatômicas, morfológicas e fisiológicas. Neste contexto, este trabalho teve como propósitos principais: caracterizar diferenças anatômicas e histoquímicas em folhas em função da condição de cultivo *in vitro* e *in vivo*; avaliar a calogênese em explantes foliares radiculares sob indução de BAP, 2,4-D ou TDZ; e identificar diferentes metabólitos secundários nos calos mediante análises fitoquímicas. Para tal, folhas de murici provenientes de cultivo *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas para estudos anatômicos e histoquímicos. As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* diferiram das cultivadas *in vitro* em vários fatores, tais como: espessamento do parênquima clorofiliano, freqüência e ocorrência de estômatos, forma e tamanho das células não especializadas da epiderme e grau de desenvolvimento do sistema vascular. Os testes histoquímicos revelaram a presença de células isoladas no parênquima de preenchimento e algumas fibras internas aos feixes com compostos fenólicos. A coloração com Vanilina Clorídrica mostrou que esses compostos fenólicos são taninos. Os resultados demonstram que na ausência de reguladores de

crescimento na composição do meio de cultura não houve formação de calos nos explantes foliares. Em explantes foliares cultivados sob ausência de luz, o 2,4-D proporcionou os melhores resultados para meio MS acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> desse regulador. Em explantes radiculares obteve-se calogênese em todos os tratamentos, incluindo o controle. O estudo fitoquímico indicou a presença de vários compostos, dentre eles, fenóis, taninos e triterpenóides. Os níveis de fenóis praticamente não diferiram em calos cultivados em meio com BAP. Porém, para o TDZ, observam-se os maiores níveis desses compostos sob irradiância de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e período de 30 dias de cultivo.

## ABSTRACT

VASCONCELOS FILHO, Sebastião Carvalho. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, march 2008. **Anatomical and histochemical characterization, callogenesis and phytochemistry of calli of murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss.)**. Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisors: Fabiano Guimarães Silva and Marília Contin Ventrella.

The murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss) belongs to the family Malpighiaceae and is widely distributed in regions of the Brazilian Cerrados. It possesses a variety of species, high nutritional and medicinal value and can be used in the tanning industry. However, the sexual propagation of the species of the genus *Byrsonima* has been hampered by the low germination and seedling emergence rates. An alternative approach that could overcome such limitations is the use of *in vitro* propagation techniques. However, the plants grown under *in vitro* as compared to *in vivo*-grown counterparts may present anatomical, morphological and physiological differences. The present study aimed: 1. to characterize anatomical and histochemical differences in leaves raised under *in vitro* and *in vivo* conditions; 2. to evaluate inductive callus conditions, as affected by 2,4-D, TDZ and BAP, for both leaf and root explants derived from *in vitro*-germinated seeds; 3. to identify different compounds in calli by means of phytochemical analyses. The leaves grown under *in vitro* and *in vivo* conditions had single-layered upper and lower epidermis, whose cells contained either phenolic compounds or mucilage. *In vitro*-grown plants possess amphistomatic leaves, presenting thin cuticle, highly sinuous abaxial epidermic cell walls, and adaxial epidermis with rectangular-shaped cell walls. Conversely, *in vivo*-grown leaves are hypostomatic, presenting thicker cuticle, walls of the epidermal cells winding least on the face and abaxial epidermal cells of the face adaxial with polygonal format. The latter displayed thicker leaves, with more differentiated spongy parenchyma, well-developed vascular system, and the presence of fibers and crystals. Histochemical tests in *in vivo*-grown leaves detected phenolic compounds occurring in the mesophyll and fundamental parenchyma cells, and

in some fibers of the vascular bundles. The staining with Vanilin Chloridric confirmed that these cells were tanniferous. Regarding callogenic responses, the MS medium lacking growth regulators did not induce callus in leaf-derived explants. However, MS-based medium supplemented with 2,4-D ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) provided the best callogenic induction when leaf explants were grown in the dark. When root explants were used, calli were formed in all tested treatments, including the control. The phytochemical analyses indicated the presence of various compounds, among them, phenols, tannins and triterpenoids. The levels of phenols hardly differ for calli grown in medium with BAP, whereas those calli differentiated in TDZ-supplemented medium presented the highest level of these compounds, moreover those raised under higher irradiance ( $150 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), after a 30 days period of culture.

## INTRODUÇÃO GERAL

A região do cerrado abrange uma área de 204 milhões de hectares, distribuídos principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal, correspondendo a aproximadamente 22% do território brasileiro (Silva et al., 2001).

Os frutos nativos do cerrado, base da sustentação da vida silvestre e fonte de alimento para as populações rurais, possuem enorme valor nutritivo, e sua comercialização tem sido realizada às margens das rodovias, em alguns mercados e em feiras da região, com grande aceitação popular. Além de consumidas *in natura*, essas frutas podem ser transformadas em sucos, sorvetes, licores, pães, bolos e deliciosas refeições e comercializado com sucesso nos grandes centros. Os sabores destes frutos lhes conferem enorme potencial para consumo interno e para exportação (Silva et al., 2001).

Devido ao processo acelerado de ocupação agrícola do Cerrado e à exploração extrativista e predatória, tem se observado quedas anuais significativas nas safras destes produtos, tornando imprescindível que seu cultivo seja iniciado (Silva et al., 2001).

Vários trabalhos vêm apontando o potencial econômico dessas espécies nativas, dentre eles, destacam-se aqueles para espécies utilizadas na alimentação e utilizadas na medicina popular como os de Rizzini & Mors (1976), Siqueira (1981), Ribeiro et al. (1986), Almeida et al. (1987), Almeida & Silva (1994), Ribeiro et al. (1992).

O nível de conhecimento sobre técnicas de plantio de nativas do Cerrado ainda é incipiente, pois estas plantas encontram-se ainda em estado silvestre, apresentando grande variabilidade genética. Seu cultivo poderá constituir uma fonte de renda alternativa para os agricultores, uma vez que existe um mercado potencial para frutas (Silva et al., 2001).

Entre as diversas espécies do Cerrado, o murici (*Byrsonima verbascifolia*) destaca-se pelo elevado valor nutricional e medicinal. De sabor forte, agridoce e ligeiramente oleoso, o fruto do murici pode ser consumido *in natura* ou em

doces, sorvetes e licores. Para uso medicinal, tem sido utilizada por suas propriedades anti-sifilítica, diurética e emética, sendo tóxica em doses elevadas. Além disso, a casca serve como antitérmico e também é adstringente, podendo ser utilizada na indústria de curtume (Almeida et al., 1998).

Porém, a propagação por meio de sementes do gênero *Byrsonima* esbarra em problemas como baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas, sendo isso decorrente da presença de um endocarpo esclerificado que envolve o embrião e que atua como barreira mecânica. Em condições naturais ou de viveiro, a germinação do murici é baixa, irregular e lenta. Estas limitações têm inviabilizado a produção de mudas desta espécie.

A necessidade de reposição de espécies nativas com potencial econômico-ecológico é amplamente reconhecida, garantindo a continuação da sua utilização comercial bem como sua sobrevivência no Cerrado brasileiro. Um mecanismo eficiente e que poderá contribuir na solução desse problema é a utilização de técnicas de propagação *in vitro*.

De fato, em que pese às dificuldades e limitações inerentes às espécies lenhosas, a propagação *in vitro*, indiscutivelmente, tem sido uma técnica muito utilizada para culturas que apresentam problemas de multiplicação por métodos convencionais, de modo especial em espécies lenhosas (George, 1993, 1996; Assis et al., 2004; Xavier et al., 2007). Portanto, essa técnica, com a adequação de protocolos específicos, pode-se apresentar como uma alternativa auxiliar na produção massal de mudas de melhor qualidade através da identificação, seleção e multiplicação de genótipos superiores de murici.

### **1.1. Descrição da espécie**

O murici pertence à família Malpighiaceae, sendo também popularmente conhecida por murici-rasteiro, orelha-de-veado, orelha-de-burro, douradinha-falsa, murico-grande, muriciguassú, murici-pequeno, murici-casendo ou murici-assú (Lorenzi, 2002).

É um arbusto hermafrodito, medindo geralmente 5 m, ou mais; tronco nodoso, frequentemente tortuoso; casca suberosa, escura, longitudinalmente fissurada. Apresenta filotaxia oposta, sendo as folhas simples, inteiras, subsésseis, com estípulas; limbo com 8 a 24 x 6 a 18 cm, oblanceolada, oboval ou suborbicular, pergaminoso a coriáceo, ápice obtuso, arredondado ou emarginado, às vezes mucronado; base cuneada a aguda; nervação um pouco elevada na face dorsal e nitidamente elevada na face ventral até as de terceira ordem. Inflorescências axilares e terminais, em racemos densos, com muitas flores de coloração amarela. Fruto drupa aproximadamente 1,3 a 1,5 cm de diâmetro, depresso-globoso, amarelo; mesocarpo carnoso, fino; núcúlo 1 a 3 lóculos com cerca de 6 mm de diâmetro, sementes 1 a 3, adnatas ao endocarpo; cálice ligeiramente acrescente no fruto (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998) O embrião é do tipo circinado, tipicamente cilíndrico, enrolado em espiral (Barroso, 1991). De acordo com Silva et al. (1994), encontram-se, aproximadamente, de 100 a 500 frutos por planta, pesando de 1 a 4 g cada (Figura 1).



**Figura 1.** Murici (*Byrsonima verbascifolia*). A – Visão geral do arbusto. B – Inflorescência em racemos densos, com muitas flores de coloração amarelada. C – Fruto drupa de cor amarela quando maduro. Barra = 1 cm.

## **1.2. Propriedades e aplicações da espécie**

No uso medicinal, utiliza-se a casca como febrífugo; o fruto, quando ingerido com açúcar, constitui um brando laxante. Além disso, também pode ser utilizado no tratamento de tosse e bronquite. É antisifilítica, diurética, emética, antimicrobiana, antihemorrágica, cicatrizante, anti-inflamatória e tóxica em doses elevadas (Almeida et al., 1998).

A madeira é amarela ou avermelhada, acetinada e brilhante, própria para a construção civil e marcenaria de luxo. Na tinturaria, a casca é utilizada para extrair corante preto usado para tingimento de tecidos, conferindo a cor cinzenta ao algodão. Por ser adstringente, também é empregada na indústria do curtume, contendo de 15 a 20% de tanino (Silva Filho, 1992). Do extrato clorofórmico da casca, obtiveram-se triterpenos, dentre eles acetato triterpênico (Fernandes et al., 1982).

De sabor forte, agridoce e ligeiramente oleoso, o fruto do murici pode ser consumido *in natura* ou em doces, sorvetes e licores. Também foi observado o consumo das folhas por bovinos da região, indicando o potencial forrageiro dessa espécie (Pereira, 2002).

## **3.3. Cultura de tecidos vegetais**

A micropropagação pode ser definida como aquela técnica de propagação vegetativa *in vitro*. Hartman e Kester (1990) sugeriram o termo micropropagação para designar o cultivo asséptico de pequenas partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. É uma técnica utilizada principalmente para aquelas plantas que apresentam dificuldades de multiplicação pela reprodução natural ou pelos métodos convencionais de propagação vegetativa, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em curto período de tempo (Thorpe et al., 1991; Xavier et al., 2007)

Nos esquemas padrões da micropropagação, os estágios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem a seleção do explante e obtenção de culturas livres de contaminantes, multiplicação dos propágulos vegetativos, enraizamento e a aclimatização das plantas obtidas *in vitro* na condição *ex vitro* (Murashige, 1974; Debergh & Read, 1991). Em função da espécie e dos objetivos a serem alcançados, algumas dessas fases podem ser mais prolongadas e, ou, uma fase pode ser adicionada, bem como outras não serem necessárias, onde a experiência, estrutura disponível, entre outros fatores, são determinantes na definição da estratégia mais adequada para o sucesso desejado (Xavier et al., 2007).

Todavia, o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de grande número de variáveis, como por exemplo a época de coleta dos explantes, o estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz e do explante no momento da coleta, o tipo de explantes, a desinfestação, o isolamento e o tamanho dos explantes, as condições de incubação, a manipulação dos explantes nas subculturas, entre outros (Murashige, 1974; Grattapaglia & Machado, 1998; Xavier et al., 2007).

Para a micropropagação de espécies lenhosas diversas dificuldades são enfrentadas durante as várias etapas do processo. Além da dificuldade para enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro*, podem ocorrer a contaminação bacteriana e fúngica e oxidação fenólica, sendo relatadas como os principais problemas enfrentados no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas (Assis & Teixeira, 1998; Teixeira, 2007; Xavier et al., 2007).

A aplicação destas e outras técnicas de cultura de tecidos possibilitaram a propagação de diversas espécies arbóreas nativas, a exemplo de louro-pardo [*Cordia (trichotoma (Vellozo) Arrabida ex Steudel)*] (Mantovani et al., 2001), caixeta [*Didymopanax morototoni (Aubl.) Dcne. et Planch*] (Mantovani et al., 1999), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (Andrade et al., 2000), juazeiro-de-bode (*Celtis* sp.) (Sato et al., 2001), pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Santos et al., 2006), dentre outras.

Há poucos trabalhos acerca da morfogênese *in vitro* do gênero *Byrsonima* e alguns relatos ainda se restringem a comunicações em congressos e dissertações (Pereira et al., 2002; Castro et al., 2003; Nogueira, 2003, Nogueira et al., 2003 a, b, c, d; Santos et al., 2003, a, b, c).

Em *Byrsonima intermedia*, estudos com a germinação *in vitro* revelaram elevadas taxas de germinação, em meios de culturas com menores concentrações de sais MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Woody Plant Medium; Lloyd & McCown, 1980), na ausência de sacarose. Quanto à utilização de TDZ (Tidiazuron) na indução de brotações em segmentos nodais, este não foi eficiente nas concentrações avaliadas. O BAP (6-benzilaminopurina) não apresentou resposta adequada na indução de multibrotações, mas proporcionou a formação de calos; constatou-se que a ocorrência de calos foi diretamente proporcional aos níveis de BAP utilizados, sendo que a concentração de 8 mg L<sup>-1</sup> proporcionou a maior ocorrência de calos, aproximadamente 90%. O AIB (ácido indolilbutírico) também não foi eficiente quanto à formação de raízes em brotações de murici-pequeno (Nogueira, 2003; Nogueira et al., 2003 a, b, c, d).

Já, para a propagação *in vitro* de *B. basiloba*, na fase de multiplicação, o meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de KIN (cinetina) foi o mais indicado para a proliferação e multiplicação de brotações (Pereira et al., 2002).

Castro et al. (2003), estudando a propagação *in vitro* de *B. verbascifolia* verificaram que o meio MS, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionou elevado percentual germinativo dos embriões e plântulas com maior acúmulo de matéria seca. Porém, não há pesquisas que indiquem meios mais adequados para indução de maior número possível de brotos para esta espécie.

Dado às dificuldades de propagação do murici por via seminífera em face ao seu potencial medicinal, este trabalho teve por finalidade caracterizar diferenças anatômicas e histoquímicas em folhas em função da condição de cultivo *in vitro* e *in vivo*; avaliar a calogênese em explantes foliares e radiculares sob indução de BAP, 2,4-D ou TDZ; e identificar diferentes metabólitos secundários nos calos mediante triagem fitoquímica.

## 2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464p. 1998.

ANDRADE, M.W. de; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). Ciência e Agrotecnologia, 24 (1):174-180, 2000.

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: CHRISTIAN, W.; CARSON, M. (Eds.). Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century. Kerala: Research Signpost, p. 303-333. 2004.

CASTRO, A.H.F., ALVAREGA, A.A., PAIVA, R., GOMES, G.A.C, ALCÂNTRA, E. Propagação do murici (*Byrsonima intermedia* ex A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMANN, R.H. (Eds.). Micropropagation - Technology and Application. Kluwer Dordrecht: Academic Publishers, p. 3-13. 1991.

FERNANDES, J.B.; VIERIA, P.C.; BROCKSON, U. Triterpenos de *Byrsonima verbascifolia*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira pra o Progresso da Ciência, 34, 1982, Campinas, SP. Resumos. Campinas: SBPC/UNICAMP, p. 488, 1982.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50:151-158, 1968.

GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). Plant propagation by tissue culture: part 1, the technology. 2.ed. Somerset: Exegetics. p.37-66, 1993.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture: part 2, in practice. 2.ed. Somerset: Exegetics. p.575-638, 1996.

HARTMANN, T.H.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. Plant propagation: principles and practices. New Jersey: Prentice Hall,. 647p. 1990

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co. Incl., 523 p. 1940.

KRAUS, J. E. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, RJ: Ed. EDUR, 1997.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2ª. ed. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagation Society, 30:421-327, 1980.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. Ciência Florestal, 9(1): 47-61, 1999.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). Ciência Florestal, 11 (2): 93-101,2001.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology, 25: 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497, 1962.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; VIEIRA, C.V.; CASTRO, A.H.F.; SANTOS, B.R.; ALVARENGA, A.A. Efeito de diferentes meios de cultura, presença de sacarose e tipo de explantes na germinação *in vitro* de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003a.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SILVA, D.P.C.; CASTRO, A.H.F.; SANTOS, B.R.; ALBERT, L.H. de B.; ALVARENGA, A.A. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 325, 2003b.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; NAVES, V.C.; MARTINOTTO, C.; ABBADE, L.C. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003c.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SILVA, D.P.C.; SOARES, F.P.; ALBERT, L.H. de B.; PAIVA, P.D. de O. Efeito de thidiazuron (TDZ) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 324, 2003d.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SILVA, D.P.C.; SOARES, F.P.; ALBERT, L.H. de B.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia, 31(2): 366-370, 2007.

PEREIRA, D.B.D. Micropropagação e estudos morfo-anatômicos do endocarpo, sementes e plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) - UnB. Brasília, 151p., 2002.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; AZEVEDO, K.S.; NOGUEIRA, R.C.; NICIOLI, P.M. Germinação *in vivo* e *in vitro* de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 234, 2003a.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, L.V. Efeito da ausência e presença de luz na indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 303, 2003b.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; NAVES, V.C.; OLIVEIRA, L.M. Indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 305, 2003c.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura, 28(2): 293-296, 2006.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L. A. de; SOUZA, V. C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. Cerne, 7(2):117-123, 2001.

SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. Frutas do cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 178 p. 2001.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Press. p. 311-336. 1991.

RIBEIRO, J.F.; PROENÇA, C.E.B.; ALMEIDA, S.P. Potencial frutífero de algumas espécies frutíferas nativas dos cerrados. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 8, 1986, Brasília, Anais... v.2, p.491-500.

RIBEIRO, J.F.; SILVA, J.A.; FONSECA, C.E.L. da. Espécies frutíferas da região do cerrado. In: DONADIO, L.C. (Coord.) Fruticultura tropical. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 268p.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. Botânica econômica brasileira. São Paulo: EDUSP, 1976. 207p.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (ed.). Biotecnologia Florestal. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, 2007, p. 53-74.

## Capítulo 1

### **Anatomia e histoquímica de folhas provenientes do cultivo *in vivo* e *in vitro* de *Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss (Malpighiaceae)**

#### **1. RESUMO**

Folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia* A. Juss.) (Malpighiaceae), oriundas do cultivo *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas para estudos anatômicos e histoquímicos. Para a análise estrutural, as amostras previamente fixadas em FAA<sub>50</sub> foram incluídas em resina sintética, seccionadas (5 µm) e coradas com Azul de Toluidina. Para caracterização da superfície foliar foram realizados cortes paradérmicos e impressão de epiderme. Os testes histoquímicos foram conduzidos em material fresco, submetidos aos reagentes: Sudan red B para compostos lipofílicos; Vermelho de Rutênio para pectatos e mucilagem; Floroglucina Ácida para lignina; Cloreto Férrico e Dicromato de Potássio para compostos fenólicos; e Vanilina Clorídrica para tanino e reagente de Wagner para alcalóides. Os resultados demonstraram que as folhas apresentaram, em ambas as condições de cultivo, a epiderme abaxial e adaxial formada por uma única camada de células revestidas por cutícula, algumas contendo compostos fenólicos e outras mucilagem. Porém as plantas do cultivo *in vitro* são anfiestomáticas, apresentando cutícula delgada, paredes das células da epiderme abaxial acentuadamente sinuosas e células da epiderme adaxial retangulares. As do cultivo *in vivo* são hipoestomáticas, apresentando cutícula espessa, paredes das células epidérmicas menos sinuosas na face abaxial e células epidérmicas da face adaxial com formato poligonal. As folhas do cultivo *in vivo* apresentaram o parênquima clorofiliano mais espesso, sistema vascular mais desenvolvido e presença de fibras e cristais. Os testes histoquímicos revelaram nas folhas *in vivo* a presença de compostos fenólicos no parênquima clorofiliano, em células isoladas no parênquima de preenchimento e algumas fibras internas aos feixes. A coloração com Vanilina Clorídrica mostrou que esses compostos são taninos.

## 2. ABSTRACT

*In vitro*- and *in vivo*-derived leaves of murici (*Byrsonima verbascifolia* A. Juss.) were used for anatomical and histochemical studies. For structural analysis, samples previously fixed in FAA<sub>50</sub>, were included in synthetic resin, and further sectioned (5 µm) and stained with Toluidine blue. Aiming to characterize the leaf surfaces, paradermic sections and printing of epidermis were used. The histochemical analyses were based on fresh material, and the following reagents were tested: Sudan Red B for lipophilic compounds; Ruthenium Red for pectates and mucilage; Acid Floroglucin for lignin; Ferric chloride and Potassium dichromate for phenolic compounds; Vanilin Chloridric for tannins; and Wagner's reagent for alkaloids. The leaves grown under *in vitro* and *in vivo* conditions had single-layered upper and lower epidermis, whose cells contained either phenolic compounds or mucilage. *In vitro*-grown plants possess amphistomatic leaves, a thin cuticle, a highly sinuous abaxial epidermic cell walls, and upper epidermis with rectangular-shaped cell walls. Conversely, *in vivo*-grown leaves are hypostomatic, presented a thicker cuticle, less sinuous cell walls at lower epidermis face, whereas upper epidermis cell walls had polygonal shape. The latter also displayed thicker leaves, with more differentiated spongy parenchyma, well-developed vascular system, and the presence of fibers and crystals. Histochemical tests in *in vivo*-grown leaves detected phenolic compounds occurring in the mesophyll and fundamental parenchyma cells, and in some fibers of the vascular bundles. The staining with Vanilin Chloridric confirmed that these compounds are tannins.

### 3. INTRODUÇÃO

A família Malpighiaceae compreende cerca de 70 gêneros e 1200 espécies distribuídas nos trópicos, especialmente na América do Sul. No Brasil há 38 gêneros com cerca de 300 espécies. Nos cerrados ocorrem cerca de 16 gêneros e 126 espécies, sendo mais comuns espécies arbustivas e arbóreas de *Byrsonima* (Souza & Lorenzi, 2005).

Entre as diversas espécies do Cerrado, o murici (*Byrsonima verbascifolia*) destaca-se por suas inúmeras utilidades, dentre elas o elevado valor nutricional e medicinal. De hábito arbóreo ou arbustivo, medindo até aproximadamente 5 m de altura, apresenta fruto do tipo drupa com aproximadamente 1,3 a 1,5 cm de diâmetro, mesocarpo carnoso e fino, núculeo 1 a 3 locular com cerca de 6 mm de diâmetro, 1 a 3 sementes adnatas ao endocarpo (Almeida et al., 1998). O embrião é do tipo circinado (Barroso et al., 2002). Ocorrem aproximadamente de 100 a 500 frutos por planta, pesando de 1 a 4 g fruto (Almeida et al., 1998).

De sabor forte, agri-doce e ligeiramente oleoso, o fruto do murici pode ser consumido *in natura* ou em doces, sorvetes e licores. Para uso medicinal, a planta é anti-sifilítica, diurética, emética e tóxica em doses elevadas. Além disso, a casca serve como antitérmico e também é adstringente, podendo ser utilizada na indústria de curtume. Fornece madeira amarela ou avermelhada e brilhante, adequada para construção civil (Almeida et al., 1998).

Em função das suas inúmeras utilidades, alguns trabalhos de propagação *in vitro* e avaliação química de suas propriedades medicinais vem sendo desenvolvidos para espécies do gênero *Byrsonima* (Nogueira et al., 2007; Figueiredo et al., 2005; Castro et al., 2003; Pereira et al., 2002; Fernandes et al., 1982).

Porém, as plantas cultivadas *in vitro* crescem em condições diferentes das plantas cultivadas *ex vitro* e, frequentemente, apresentam peculiaridades anatômicas, morfológicas e fisiológicas. As condições como alta umidade, baixa irradiância, baixas trocas gasosas, alta disponibilidade de água no substrato, além de minerais, reguladores de crescimento, carboidratos e outros compostos

orgânicos, são os principais fatores que levam a um desenvolvimento anatômico incipiente, e, ou, alterado nas plantas cultivadas *in vitro* (Kozai, 1991; Majada et al., 2000; Zobayed, 2006).

Caracteres morfológicos e anatômicos, tanto vegetativos quanto reprodutivos, estão relacionados com determinadas condições ambientais, embora a relação entre esses caracteres adaptativos e condições ambientais, em muitos casos, seja difícil de estabelecer (Ehrendorf, 1973). Reeve & Sherman (1993) definem a adaptação como uma variante fenotípica, que resulta no êxito reprodutivo entre um conjunto específico de variantes em determinado ambiente. Segundo os autores, o termo adaptação tem sido utilizado em anatomia vegetal para descrever caracteres anatômicos associados a determinadas condições ambientais.

Avaliar essas modificações estruturais durante o cultivo *in vitro*, comparativamente ao cultivo *in vivo*, é pré-requisito importante para a compreensão deste processo e necessário ao desenvolvimento de protocolos de aclimatização mais eficientes (Donnelly et al., 1985; Wetztein et al., 1983). Com isso, busca-se reduzir os estresses advindos da passagem da condição *in vitro* para a *ex vitro*, reduzindo as perdas de plantas, bem ainda alterar algumas condições de cultivo de forma a rustificar a planta ainda na condição *in vitro*.

Objetivou-se nesse trabalho identificar as principais modificações anatômicas nas folhas de *Byrsomina verbascifolia*, em função do cultivo *in vitro* e *in vivo*, e identificar mediante técnicas de histoquímica as principais substâncias produzidas e acumuladas nas folhas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas folhas herborizadas e frescas completamente expandidas de plantas de *Byrsonima verbascifolia*, coletadas no município de Paraúna, estado de Goiás; e folha de plantas obtidas a partir de germinação *in vitro*, cultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, e tampados com tampas de polipropileno. O meio foi solidificado com 0,7% (p/v) de ágar (Merck, Alemanha) e seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

A incubação foi realizada à luz, sob com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **4.1. Microscopia de luz**

A caracterização anatômica e histoquímica em microscopia de luz foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, assim como a documentação fotográfica do material.

#### **4.1.1. Caracterização anatômica**

Foram utilizadas folhas das plantas do cultivo *in vitro* e folhas herborizadas provenientes de plantas *in vivo*, a última foi submetida à técnica de reversão de herborização segundo Smith & Smith (1942). As amostras foram fixadas em FAA<sub>50</sub> por 24h (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica crescente até inclusão em metacrilato (Historesin, Leica), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram obtidos cortes transversais com 5 $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), com navalha de aço descartável. Os cortes foram submetidos à coloração com Azul de Toluidina (O'Brien & McCully, 1981) e as lâminas montadas em resina sintética

(Permunt). Para caracterização da superfície foliar foram realizados cortes paradérmicos e impressão de epiderme.

#### **4.1.2. Caracterização histoquímica**

Amostras da região mediana de folhas foram tratadas com solução de criopreservação a 2,3 M, com tampão fosfato de sódio a 0,1 M em geladeira por 12 horas. Posteriormente, foram seccionadas em criomicrotomo (Leica CM 1850 - Laboratório de Associações Micorrízicas, BIOAGRO), com 50 µm de espessura, e posteriormente submetidas a técnicas histoquímicas.

Utilizou-se Sudan Red B para compostos lipídicos; Vermelho de Rutênio para pectatos e mucilagem; Floroglucina Ácida para lignina; Cloreto Férrico e Dicromato de Potássio para compostos fenólicos (Johansen, 1940); Vanilina Clorídrica para tanino (O'Brien & McCully, 1981); e reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981) para alcalóides.

#### **4.1.3. Documentação fotográfica**

A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus-AX 70, Japão), acoplado a um sistema U-Photo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1-Material *in vitro*

As folhas de *B. verbascifolia* de plantas cultivadas *in vitro* são anfiestomáticas, com estômatos paracíticos, mais concentrados na face adaxial (Figuras 1 A, B e 2 A, D). Em vista frontal as células epidérmicas propriamente ditas da face abaxial são levemente sinuosas; já na adaxial são alongadas com paredes retas.

Em cortes transversais observa-se epiderme unisseriada com células cubóides e achatadas com as paredes retas ou paredes periclinais, internas e externas ligeiramente convexas e revestidas por cutícula delgada nas duas superfícies da folha, como observado nos cortes corados com Sudan Red B, marcando a cutícula em vermelho, uma vez que essa é extremamente fina, nota-se sua presença através desta coloração apenas nas regiões basais dos tricomas, já que esses também são revestidos por essa camada lipídica (Figuras 2B e C, 3A e B).

Nota-se ainda a presença de compostos fenólicos marcados de verde, em algumas células ordinárias de epidermes, e mucilagem marcada de roxo, em algumas células da epiderme na face adaxial, através da coloração com Azul de Toluidina (Figura 2B e C). A presença de mucilagem também foi confirmada ao corar os cortes com Vermelho de Rutênio (Figura 3C).

Tricomas tectores unicelulares são encontrados nas duas faces foliares, porém são mais abundantes na face abaxial. Estes são longos e extremamente frágeis (Figura 3A).

A análise da região da nervura principal mostra que abaixo da face adaxial, ocorrem duas camadas de células volumosas e com paredes um pouco mais espessas que as células subjacentes. Células isodiamétricas do parênquima de preenchimento são observadas entre essas células e as do feixe vascular (Figura 1A).

O feixe vascular é do tipo colateral, com a região convexa voltada para a face abaxial (Figura 1 A). Os feixes vasculares das nervuras de menor calibre são também colaterais com bainha de células parenquimáticas que se confundem com as células do parênquima lacunoso. Após reação com Floroglucina ácida, a presença de lignina nas paredes dos elementos de vaso foi evidenciada pela coloração vermelha na região do xilema (Figura 3D).

O mesofilo é heterogêneo com organização dorsiventral. O parênquima paliádico possui uma única camada de células alongadas, bem justapostas e ocorre logo abaixo da epiderme na face adaxial. O parênquima lacunoso, por sua vez, possui de três a quatro camadas de células isodiamétricas com espaços intercelulares relativamente pequenos e ocorre logo acima da epiderme na face abaxial (Figura 2 A-D).

## **5.2-Material *in vivo***

As folhas de *B. verbascifolia* de plantas *in vivo* são hipoestomáticas, com estômatos paracíticos (Figuras 1C e D, 2J). Em vista frontal as células epidérmicas propriamente ditas da face adaxial são poligonais, já na abaxial são bastante irregulares em diversos tamanhos (Figura 1C e D).

Em cortes transversais observa-se epiderme unisseriada com células cubóides e achatadas com as paredes retas ou paredes periclinais externas ligeiramente convexas e revestidas por cutícula espessa nas duas superfícies da folha, como observado nos cortes corados com Sudan Red B, marcando a cutícula em vermelho (Figura 5). Nota-se a presença de compostos fenólicos marcados de verde, em algumas células da epiderme, e muitas células com conteúdo mucilaginoso marcada de roxo, em muitas células da epiderme das duas superfícies, através da coloração com Azul de Toluidina (Figura 2 G-J).

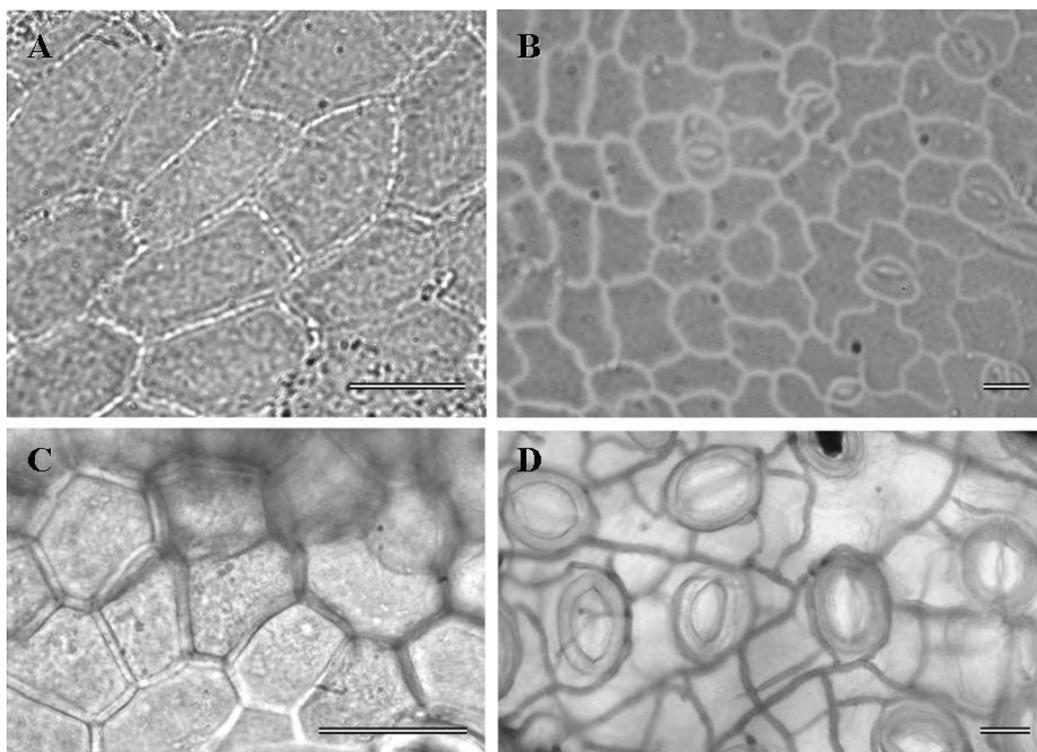
Os cortes transversais, sob luz polarizada, permitiram a observação de cristais nos parênquimas paliádico e de preenchimento (Figura 4).

O feixe vascular é do tipo colateral, porém nessa condição de cultivo observa-se a presença de dois feixes e uma bainha de fibras com paredes bastante

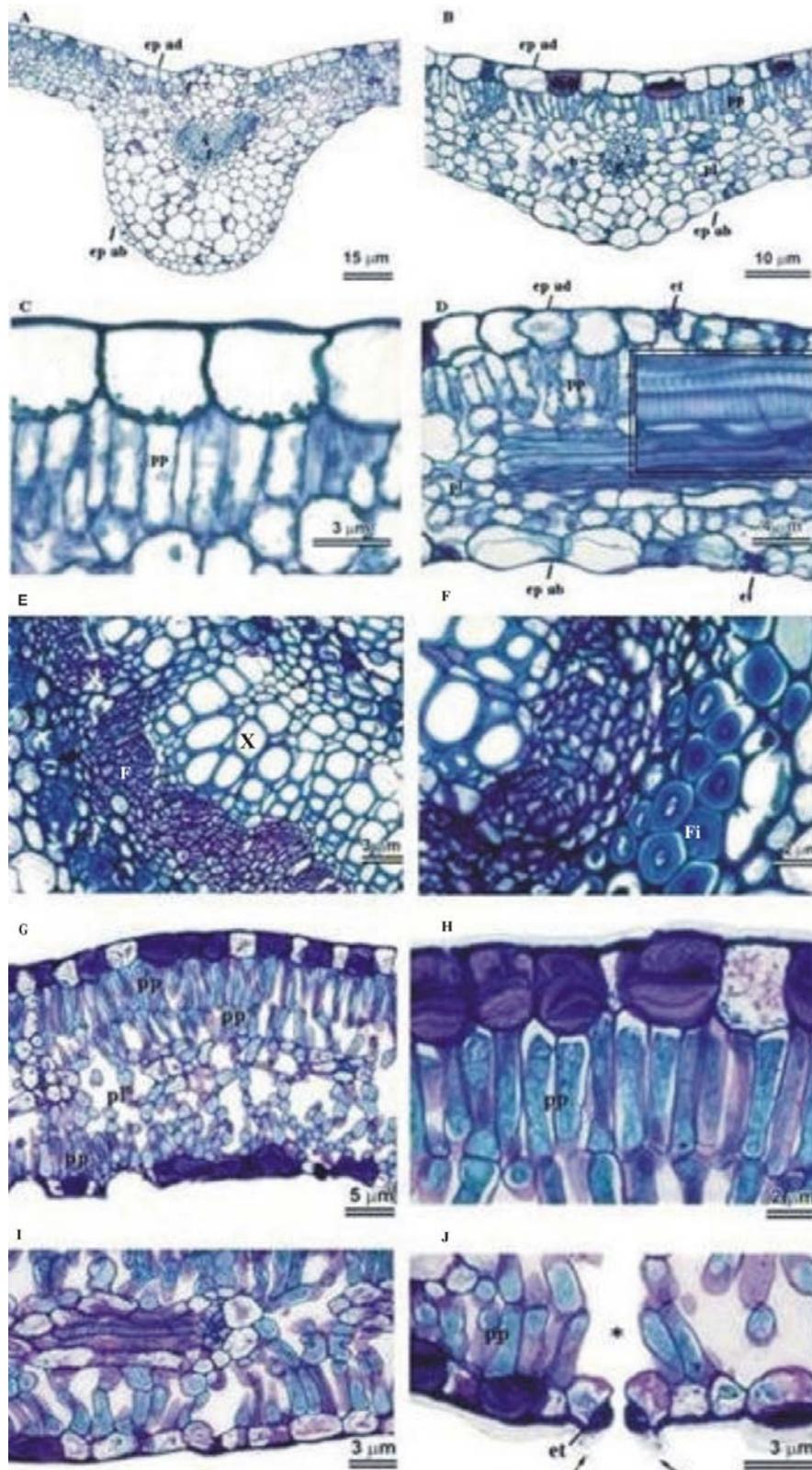
espessas externamente aos feixes, já na região medular, também ocorrem fibras, porém com paredes mais finas (Figura 2E e F).

Os feixes vasculares das nervuras de menor calibre são também colaterais com bainha de células que se confundem com as células do parênquima lacunoso.

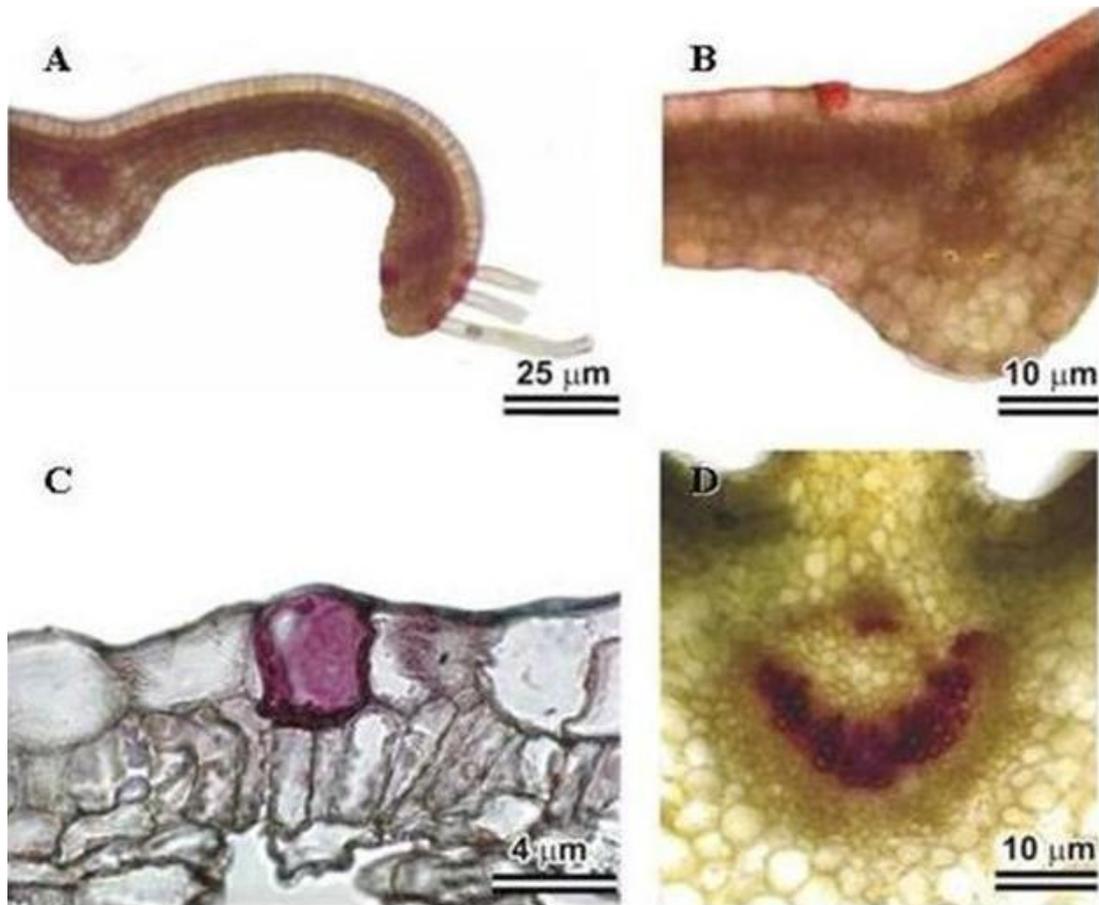
O mesofilo é heterogêneo com organização isobilateral. O parênquima paliçádico abaixo da face adaxial é estratificado em duas camadas de células alongadas, bem justapostas no primeiro estrato. Além disso, observa-se a presença de uma única camada de células em paliçada logo acima da epiderme abaxial; enquanto que o parênquima lacunoso possui de quatro a seis camadas de células isodiamétricas com espaços intercelulares consideravelmente grandes (Figura G-J).



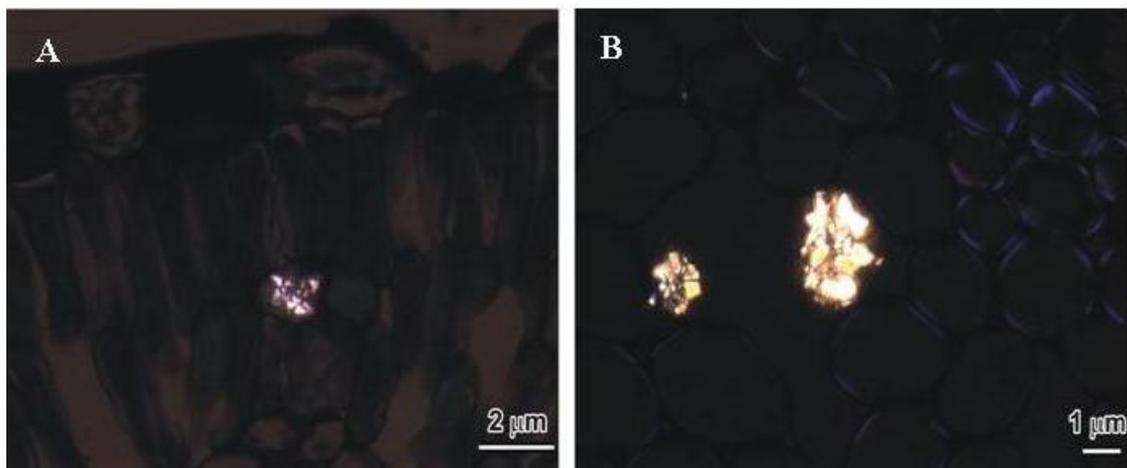
**Figura 1.** Seções paradérmicas da epiderme da face adaxial (A e C) e abaxial (B e D) de folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia*) cultivadas *in vitro* (A-B) e *in vivo* (C-D). Barra = 5  $\mu$ m.



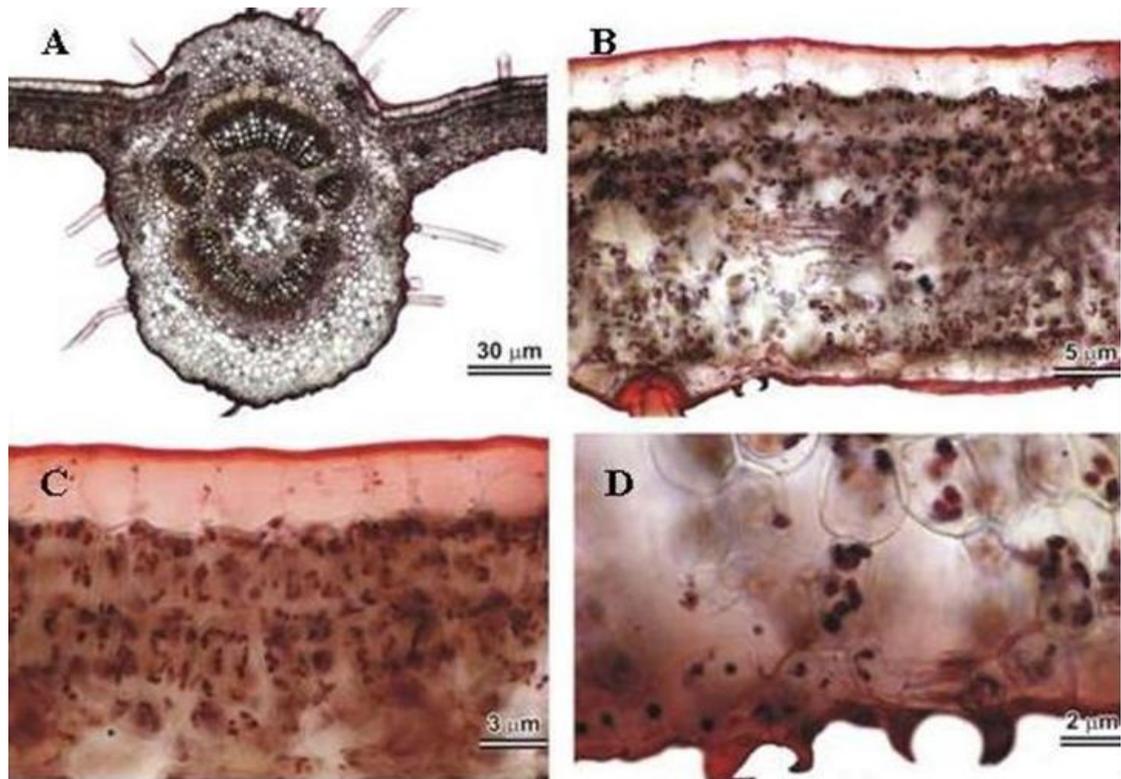
**Figura 2.** Seções transversais da folha de murici (*Byrsonima verbascifolia*). A – D: cultivo *in vitro*. E – J: cultivo *in vivo*. **b**: bainha do feixe, **ep ab**: epiderme abaxial, **ep ad**: epiderme adaxial, **et**: estômato, **pp**: parênquima paliçádico, **pl**: parênquima lacunoso, **F**: floema, **Fi**: fibra, **x**: xilema, (\*) câmara subestomática, (setas) cristas estomáticas.



**Figura 3.** Cortes transversais da folha de murici (*Byrsonima verbascifolia*) do cultivo *in vitro*. Sudan red B (A e B), Vermelho de Rutênio (C) e Floroglucina ácida (D).



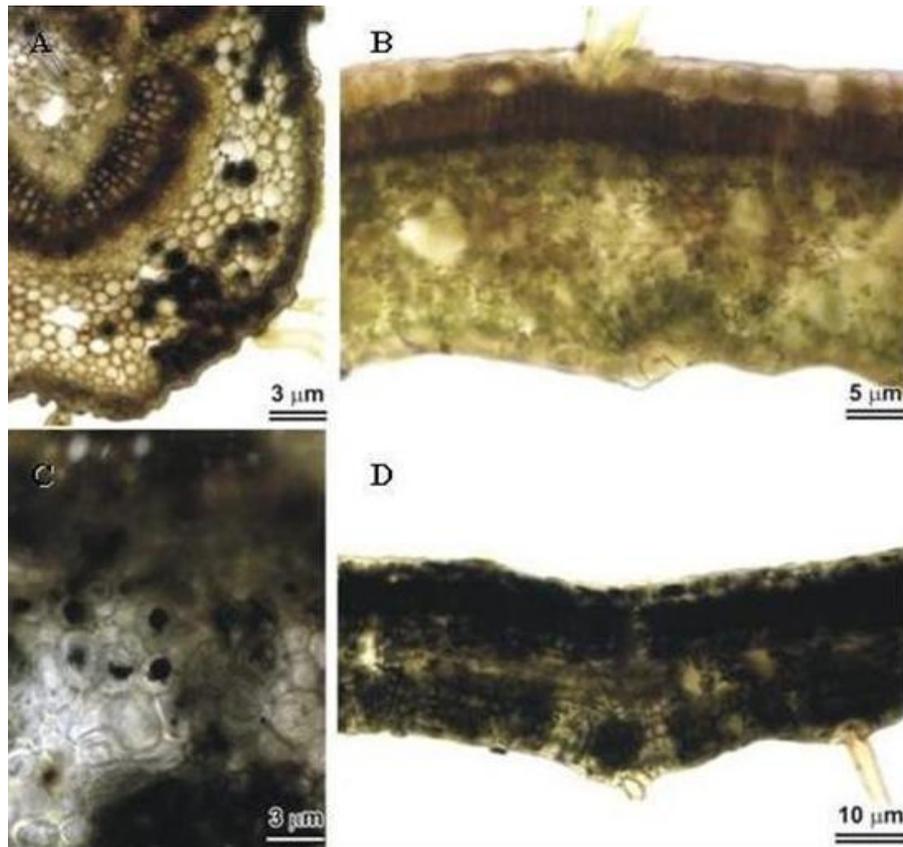
**Figura 4.** Cortes transversais da folha de murici (*Byrsonima verbascifolia*) do cultivo *in vivo* sob luz polarizada, revelando a presença de cristais.



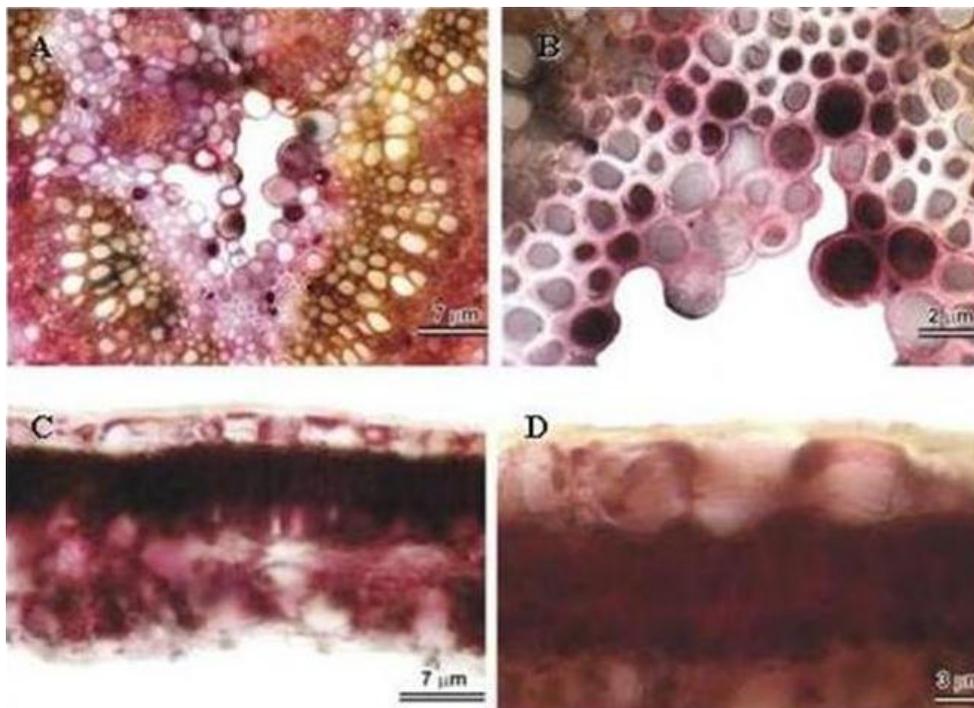
**Figura 5.** Seções transversais de folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia*) do cultivo *in vivo* submetidas ao Sudan red B. A – Aspecto geral da região da nervura principal. B – região do mesofilo. C – Epiderme adaxial com cutícula espessa. D – Epiderme abaxial, cristas estomáticas.

Os testes histoquímicos revelaram, após reação com Cloreto Férrico e Dicromato de Potássio, células isoladas no parênquima de preenchimento com compostos fenólicos. Também foram positivos em algumas fibras internas aos feixes e para as células do parênquima paliçádico (Figura 6).

A coloração com Vanilina Clorídrica mostrou que esses compostos fenólicos são taninos (Figura 7). O teste para alcalóide foi negativo nos tecidos da folha. Os resultados são mostrados na Tabela 1.



**Figura 6.** Seções transversais de folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia*) do cultivo *in vivo* submetidas a: A e B – Dicromato de Potássio. C e D – Cloreto Férrico.



**Figura 7.** Seções transversais de folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia*) do cultivo *in vivo* submetidas à Vanilina Clorídrica. A e B – Fibras na região da nervura principal. C e D – Parênquima paliádico.

**Tabela 1.** Testes histoquímicos realizados em folhas de murici (*Byrsonima verbascifolia*) provenientes do cultivo *in vivo*.

Tecido	Sudan red B	Vermelho de Rutênio	Floroglucina Ácida	Cloreto Férrico	Dicromato de Potássio	Vanilina Clorídrica	Reagente de Wagner
<b>Epiderme Adaxial</b>	+	+	-	+	+	+	-
(cutícula)							
<b>Epiderme Abaxial</b>	+	+	-	+	+	-	-
(cutícula)							
<b>Parênquima Paliçádico (Face adaxial)</b>	-	-	-	+	+	+	-
<b>Parênquima Paliçádico (Face abaxial)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Parênquima Lacunoso</b>	-	-	-	+	+	+	-
<b>Parênquima de Preenchimento</b>	-	-	-	+	+	-	-
<b>Xilema (elementos de vaso + fibras).</b>	-	-	+	+	+	+	-
<b>Floema</b>	-	-	-	-	-	-	-

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram observadas alterações estruturais em função dos ambientes de cultivo *in vivo* e *in vitro* e coerentes com o descrito na literatura. As plantas crescidas *in vitro* apresentaram cutícula delgada, paredes das células da epiderme abaxial acentuadamente sinuosas e células da epiderme adaxial retangulares. Ao contrário, as do cultivo *in vivo* apresentaram cutícula espessa, paredes das células epidérmicas menos sinuosas na face abaxial e células epidérmicas da face adaxial com formato poligonal. Como esperado, as folhas do cultivo *in vivo* apresentaram parênquima clorofiliano mais espesso, sistema vascular mais desenvolvido, maior quantidade de fibras, além da ocorrência de cristais.

Vários trabalhos têm demonstrado variações na forma e tamanho das células epidérmicas, em função do ambiente de cultivo. Algumas características como, por exemplo, a sinuosidade das paredes anticlinais das células epidérmicas pode ser atribuída às condições ambientais, sendo mais acentuada em plantas que se desenvolvem a sombra ou em ambientes úmidos (Wilkinson, 1979). Uma atribuição a essa característica é que a curvatura das paredes nas células epidérmicas aumenta a eficiência para a captação da luz (Boné et al., 1985).

Essas variações nas células comuns e especializadas da epiderme são fundamentais para o processo de adaptação das plantas em diferentes condições ambientais, otimizando os processos de trocas gasosas e transpiração. À semelhança da condição *in vivo*, a presença da cutícula no cultivo *in vitro* é importante, uma vez que evita a perda excessiva de água para o ambiente e dessa forma, favorece a sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização (Castro et al., 2007).

Todavia, apesar das vantagens da propagação *in vitro*, esta técnica pode produzir plantas com certas características peculiares, tais como partes aéreas muito pequenas, menor quantidade de cêra cuticular e epicuticular nas folhas, tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de água, estômatos não-funcionais e folhas finas, pequenas, com

poucos tricomas e com baixa atividade fotoautotrófica (Donnelly e Vidaver, 1984; Donnelly et al., 1985; Kozai, 1991; Kozai & Kubota, 2001; Afreen, 2004; Kitaya et al., 2005). Essas características surgem em razão da restrição à troca de gases, imposta com o objetivo de proteger a cultura asséptica de contaminações e prevenir a perda de água pela plântula e pelo meio de cultivo. A elevada umidade relativa e a concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente interno dos frascos podem influenciar características anatômicas, fisiológicas e morfológicas (Fujiwara et al.; 1987; Afreen, 2004; Kitaya et al., 2005; Zobayed, 2006).

Em alguns casos, folhas adaptadas a ambientes bastante ensolarados ou bastante sombrios são, muitas vezes, incapazes de sobreviver em outro tipo de habitat, uma vez que, dentre vários fatores, diferem em suas taxas respiratórias, alterando a relação entre respiração e fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004).

Como mencionado anteriormente, na condição *in vitro* pode haver alterações na morfologia, tamanho, densidade e funcionalidade estomáticas, na quantidade de cera epicuticular depositada, no número de camadas do mesofilo (Afreen, 2004). Porém, a situação caracterizada pela alteração do posicionamento dos estômatos, de epiestomático pra anfiestomático, como ocorreu no presente trabalho, é de ocorrência mais restrita na literatura especializada.

Nogueira et al. (2003) também observaram que a estrutura foliar de plantas de *Byrsonima intermedia* desenvolvidas *in vivo* apresentaram o parênquima paliçádico e a epiderme (abaxial e a adaxial) mais espessos e sistema vascular mais desenvolvido em comparação às oriundas do cultivo *in vitro*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fréitez et al. (2004), estudando a anatomia foliar de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em três ambientes diferentes de crescimento, onde observou que as lâminas foliares das plantas em condições *in vitro*, durante a fase de aclimatização e em campo mostram uma epiderme uniestratificada em ambas as superfícies, com cutícula muito fina nos primeiros casos e ligeiramente engrossada no terceiro, com folhas *in vitro* anfiestomáticas, ao passo que as plantas da fase de aclimatização e campo são hipoestomáticas.

Trabalhando com anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi, Barbosa et al. (2006) comentaram que não houve modificações na estrutura básica das folhas, porém, ocorreram diferenças na frequência estomática, no espessamento da cutícula e de paredes das células epidérmicas.

A anatomia foliar é altamente especializada para a absorção de luz. As propriedades do mesofilo, de modo especial do parênquima paliçádico, garantem a otimização da absorção de luz (Spurr & Barnes, 1980; Nobel, 1991). Chazdon & Kaufmann (1993) analisaram as folhas do arbusto tropical *Piper arieianum* (Piperaceae) e constataram variação significativa dependente da luz na espessura total foliar, espessura da epiderme superior, espessura do parênquima paliçádico e alongamento dos estratos do parênquima lacunoso.

De acordo com Sert (1992), folhas de sombra são mais finas que as de sol devido ao consumo de assimilados para a expansão da área foliar. Em *Fragaria virginiana* Mill., uma espécie adaptada à sombra, com o incremento da intensidade da luz houve aumento na quantidade de tecidos no mesofilo, favorecendo o desenvolvimento de tecido paliçádico, evidenciado pelo aparecimento de várias camadas bem organizadas, as quais elevaram significativamente a capacidade fotossintetizante (Chabot et al., 1979).

Diferenças anatômicas foram encontradas entre folhas de plântulas de cafeeiro *in vitro* e aquelas propagadas *in vivo*. Nas folhas *in vitro* não houve formação de esclerênquima, além de menor número de células do xilema comparativamente as folhas do cultivo *in vivo* (Santos, 2001). Donnelly & Vidaver (1984) relataram que as folhas *in vitro* de framboesa vermelha apresentavam uma camada de células do parênquima paliçádico, enquanto as folhas *in vivo* duas ou mais camadas.

Castro et al. (2007), estudando as adaptações foliares em *Mikania glomerata*, em diferentes níveis de sombreamento, observaram maior desenvolvimento da nervura principal em plantas menos sombreadas. Esse considerado um indicativo de que a planta apresenta adaptabilidade maior a locais de sombreamento moderado, uma vez que no tratamento em pleno sol,

essa região apresentou redução no desenvolvimento, similar a ambientes com níveis elevados de sombreamento.

Abreu (1994) cita que a luz interfere nas atividades enzimáticas, promovendo a formação da fenilalanina e da tirosina. A presença de enzimas em tecidos diferenciados catalisa a desaminação dessas substâncias para a síntese de unidades monoméricas aromáticas precursoras da lignina.

Entre os testes histoquímicos empregados, foi possível a marcação de compostos fenólicos, em especial os taninos nas folhas de *Byrsonima verbascifolia*. Porém, além das folhas, também é mencionada a presença desses compostos na casca de espécies do gênero *Byrsonima* (Corrêa, 1984).

Na triagem fitoquímica em plantas de *Byrsonima verbascifolia* foi detectada a presença de triterpenóides em sua casca e, taninos, flavonóides e triterpenos nas folhas (Silva Filho, 1992; Lorenzi & Matos, 2002;). Do extrato clorofórmico da casca, obtiveram-se triterpenos, dentre eles acetato triterpênico (Fernandes et al., 1982).

De fato, a presença marcante de taninos detectada é coerente com a ampla utilização da espécie para o beneficiamento de couro em cortumes. Ainda, os taninos, são provavelmente os mais importantes dissuasores alimentares de herbívoros nas angiospermas. Seu sabor adstringente repele os insetos, répteis, pássaros e outros animais. Ficam retidos nos vacúolos das células, evitando o contato com outros componentes celulares.

Os testes histoquímicos têm sido amplamente aplicados, sendo possível a identificação de compostos produzidos pelas plantas, sejam eles derivados do metabolismo primário ou secundário, podendo se fazer o reconhecimento de sua natureza e locais de ocorrência nos tecidos da planta. Sant'Anna-Santos et al. (2006), trabalhando com a caracterização estrutural e histoquímica do sistema secretor de caules de *Sapondias dulcis*, relataram a presença de ductos e idioblastos, sendo que os testes histoquímicos revelaram a presença de taninos nos idioblastos corticais e óleos essenciais, polissacarídeos e compostos fenólicos na secreção dos ductos. Já, Francino et al. (2006) evidenciaram por meio de testes histoquímicos o acúmulo de tanino nas células do parênquima nectarífero

de *Chamaecrista trichopoda*, onde, segundo os autores, esse composto poderia atuar como uma proteção à herbivoria.

Os resultados do presente trabalho indicam que as folhas de *Bysonima verbascifolia* apresentam plasticidade fenotípica, uma vez que foram observadas variações em sua estrutura, como: presença de fibras, camadas adicionais de tecido no parênquima clorofiliano, espessamento da cutícula, formato e sinuosidade das células epidérmicas em função das condições de cultivo avaliadas. Já o estudo histoquímico permitiu localizar células isoladas e tecidos onde algumas substâncias químicas, como compostos fenólicos, são acumuladas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, DOS S. Biossíntese de Lignificação. Ed. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 63 p,1994.

AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Dordrecht. p.59-87, 2004.

ALMEIDA, S.P. de; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464p, 1998.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41(2):185-194, 2006.

BARROSO, G.M; PEIXOTO, A.L; ICHASO, C.L.F; GUIMARÃES, E.F; COSTA, C. G. Sistemática de Angiospermas do Brasil. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, v.2, 377p., 2002.

BONE, R.A.; LEE, D.W.; NORMAN, J.M. Epidermal cells functioning as lenses in leaves of tropical rain-forest shade plants. Applied Optics, 24:1408-1412, 1985.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SOARES, A.M.; MELO, H.C.; BERTALUCCI, S.K.V.; VIEIRA, C.V.; JÚNIOR, E.C.L. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 9(2):8-16, 2007.

CHABOT, B.F.; JURIK, T.W.; CHABOT, J.F. Influence of instantaneous and integrated light-flux density on leaf anatomy and photosynthesis. American Journal of Botany, 66(8):940-5, 1979.

CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. Functional Ecology, 7:385-394, 1993.

CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, v.1., n.6, 1984.

DONNELLY, D.J. & VIDAVER, W.E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 109:177-181, 1984.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:43-50, 1985.

EHRENDORFER, F. Adaptative significance of major taxonomic characters and morphological trends in angiosperms. In: HEYWOOD, V.H. (Ed.). *Taxonomy and ecology*. London: Academic Press, p.317-327, 1973.

FRANCISNO, D.M.T; SANT'ANNA-SANTOS, B.F; SILVA, K.L.F; THADEO, M; MEIRA, R.M.S.A; AZEVEDO, A.A. Anatomia foliar e caulinar de *Chamaecrista trichopoda* (Caesalpinioideae) e histoquímica do nectário extrafloral. *Planta Daninha*, v.24, n 4, p. 695-705, 2006.

FERNANDES, J.B., VIERIA, P.C., BROCKSON, U. Triterpenos de *Byrsonima verbascifolia*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira pra o Progresso da Ciência, 34, 1982, Campinas, SP. Resumos. Campinas: SBPC/UNICAMP, p. 488, 1982.

FIGUEIREDO, M.E.F., MICHELIN, D.C., SANNOMIYA, M., SILVA, M. A., SANTOS, L.C., ALMEIDA, L.F.R., BRITO, A.R.M., SALGADO, H.R.N., VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1): 79-83 , 2005.

FRÉITEZ, Y.H., CÁSARES, J.P. Anatomia foliar comparada de plantas de Jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en três ambientes de crecimiento. *Bioagro*, 16(1): 27-30, 2004.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. WATANABE, I. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *Journal of Agricultural Meteorology*, 43:21-31, 1987.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. & BORIN, M. R. DE M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Ed. Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 268 p. 1996.

JENSEN, R. A. The shikimate arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum*, 66:164-168, 1986.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Incl., 523 p. 1940.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on in vitro air movement and its impact on plantlets photosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83:251-257, 2005.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (Eds). *Micropropagation technology and application*. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers. p.447-469. 1991.

KRAUS, J. E. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica, RJ: Ed. EDUR, 1997.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 2<sup>a</sup>. ed. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 1998.

MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63:207-241, 2000.

MARTINS, S., MACHADO, S.R., ALVES, M. Adaptações foliares de *Cyperus maritimus* Poir (Cyperaceae) ao ambiente de dunas litorâneas: anatomia e ultra-estrutura. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (supl. 1):30-32, 2007.

MELO-DE-PINNA, G. F. A. Anatomia foliar de *Richterago Kuntze* (Mutisieae, Asteraceae). *Acta botanica brasílica*, 18(3):591-600, 2004.

MENDES, C.C., CRUZ, F.G., DAVID, J.M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Química Nova*, 22(2): 185-188, 1999.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:135-166, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.

NOBEL, P. S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, San Diego, 635 p, 1991.

NOGUEIRA, R.C. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímica de Murici-Pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss). Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 89 p., 2003.

O'BRIEN, T. P. & MCCULLY, M. E. *The study of plant structure principles and selected methods*. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45p., 1981.

- PEREIRA, D.B.D. Micropropagação e estudos morfo-anatômicos do endocarpo, sementes e plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) - UnB. Brasília, 151p., 2002.
- REEVE, H.K.; SHERMAN, P.W. Adaptation and the goals of evolutionary research. *Quarterly Review of Biology*, 68:1-32, 1993.
- SANT'ANNA-SANTOS, B.F; THADEO, M; MEIRA, R.M.S.A; ASCENSÃO, L. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forts. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*, 30(3):481-489, 2006.
- SANTOS, C.G. Micropropagação e caracterização bioquímica-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 110 p, 2001.
- SERT, M.A. Anatomia foliar e teores de clorofila em três variedades de soja [*Glycine max* L.) Mill.] e dois níveis de radiação solar. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 66p. 1992.
- SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. Frutas do cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 178 p. 2001.
- SMITH, F.H.; SMITH, E.C. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany*, 29:464-471, 1942.
- SOUZA, V.C ; LORENZI, H. Botânica Sistemática. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 640p. 2005.
- SPURR, S.J.; BARNES, B.V. *Forest Ecology*. New York: Ronald Press, 571p. 1980.
- STANDLEY, L. A. Variation of stomatal distribution in *Carex aquatilis* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 73(10):1393-1399, 1987.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre:Atmed, 719p. 2004.
- WILKINSON, H.P. The plant surface (mainly leaf). In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. (Ed.). *Anatomy of the dicotyledons*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford:Clarendon Press, v.1, p.97-162, 1979.
- ZOBAYED, S.M.A. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S. & IBARAKI, Y. (Eds.). *Plant Tissue Culture Engineering*. Netherlands: Springer, p. 313-327, 2006.

## Capítulo 2

### Calogênese e triagem fitoquímica dos calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex Juss).

#### 1. RESUMO

O murici é uma planta do cerrado muito utilizada por suas propriedades medicinais. Objetivando desenvolver uma via alternativa para a propagação dessa espécie, o presente trabalho teve como propósitos principais estudar a calogênese e identificar diferentes compostos nos calos por meio de análises fitoquímicas. Os resultados demonstraram que na ausência de reguladores de crescimento na composição do meio de cultura não houve formação de calos nos explantes foliares. O 2,4-D proporcionou os melhores resultados para o meio MS acrescido de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  desse regulador em explantes foliares no escuro. Em explantes radiculares observou-se formação de calos em todos os tratamentos, incluindo o controle. O estudo fitoquímico dos calos radiculares indicou a presença de vários compostos, dentre eles, fenóis, taninos e triterpenóides. Os níveis de fenóis praticamente não diferiram para os calos cultivados em meio com BAP. Porém, para o TDZ, observaram-se os maiores níveis desses compostos na irradiância mais elevada ( $150 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e no período de 30 dias de cultivo.

## 2. ABSTRACT

The murici is a native Brazilian species occurring in Cerrado, and widely used for its medicinal properties, due to the presence of triterpenoids in its shell, and tannins, flavonoids and triterpenes in the leaves. The present study aimed: 1. to evaluate inductive callus conditions, as affected by 2,4-D, TDZ and BAP, for both leaf and root explants derived from *in vitro*-germinated seeds; 2. to identify different compounds in calli by means of phytochemical analyses. The results indicate that in the absence of regulators of growth in the culture medium there is no callusing response on leaf explants. However, MS-based medium supplemented with 2,4-D ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) provided the best callogenic induction when leaf explants were cultured in the dark. When root explants were used, calli were formed in all tested treatments, including the control. The phytochemical analyses indicated the presence of various compounds, among them, phenols, tannins and triterpenoids. The levels of phenols hardly differ for calli grown in medium with BAP, whereas those calli differentiated in TDZ-supplemented medium presented the highest level of these compounds, moreover those raised under higher irradiance ( $150 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) after a 30 days period of cultivation.

### 3. INTRODUÇÃO

O gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae), destaca-se pela sua grande variedade de espécies, conhecidas popularmente como murici, e também pelo seu elevado valor nutricional e medicinal. O fruto, de sabor forte, agridoce e ligeiramente oleoso, pode ser consumido *in natura* ou em forma de doces, sorvetes e licores. Suas folhas são usadas popularmente como anti-sifilítica, diurética e emética, sendo tóxicas em doses elevadas. A casca do caule, além de utilizada como antitérmico, também possui propriedade adstringente, sendo empregada na indústria de curtume (Almeida et al., 1998).

A propagação por meio de sementes de espécies do gênero *Byrsonima* esbarra em problemas como baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas, sendo isso decorrente da presença de um endocarpo esclerificado que envolve o embrião e que atua como barreira mecânica. Em condições naturais ou de viveiro, a germinação dessas espécies é baixa, irregular e lenta (Lorenzi, 2002).

Um mecanismo eficiente que pode contribuir para a solução desse problema é a utilização de técnicas de propagação *in vitro*. A propagação *in vitro*, indiscutivelmente, tem sido uma técnica muito utilizada para culturas que apresentam problemas de multiplicação por métodos convencionais, de modo especial, para espécies lenhosas (George, 1993, 1996; Assis et al., 2004; Xavier et al., 2007).

Desta forma, tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação podem adquirir novas competências pela ação de determinados sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (epigênese). A resposta final é a expressão morfo genética em dois níveis básicos: organogênese direta ou indireta e embriogênese somática direta ou indireta (Reinert, 1977). O calo constitui-se de massas celulares desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*, podendo apresentar determinado grau de diferenciação (Reinert, 1977). Sua origem pode se dar em resposta a injúrias

físicas ou químicas. O calo é considerado uma forma potencial de propagação em massa (Pierik, 1987).

Calos friáveis têm sido obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985) ou com a associação de uma auxina e uma citocinina (Dublin, 1980; Pierson et al., 1983), consistindo o sistema unifásico de cultivo. Em outro sistema, o bifásico, os explantes são cultivados em um meio primário com alta razão auxina/citocinina, onde se inicia a proliferação dos calos que são transferidos para um segundo meio, onde a razão auxina/citocinina é reduzida, para que ocorra o desenvolvimento das células embriogênicas em embriões (Söndahl & Sharp, 1977; Dublin, 1984; Noriega & Söndahl, 1993; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996).

Em espécies de interesse medicinal, o cultivo de calos tem sido uma estratégia valiosa e amplamente utilizada conforme revisto por Rout et al. (2000), Nalawade et al. (2003) e Vanisree et al. (2004). Pode ser utilizado na morfogênese e regeneração indireta, em estudos de desenvolvimento e diferenciação celular e na exploração de produtos provenientes do metabolismo primário e secundário mediante o cultivo de órgãos isolados (como raízes) e a partir do estabelecimento de suspensões celulares (Vanisree et al., 2004). Ainda, o cultivo de calos e suspensões celulares tem possibilitado entender melhor a questão nutricional das células e também as vias metabólicas e as enzimas envolvidas na síntese de compostos secundários bioativos (Dicosmo & Misawa, 1995; Vanisree et al., 2004).

É relatado que a produção de metabólitos secundários pode aumentar ou diminuir quando a composição do meio de cultura é alterada, principalmente quando se modifica a concentração e natureza de compostos com nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, reguladores de crescimento e fonte de carbono, ou ainda quando é adicionado ao meio, substâncias que interferem na rota metabólica do composto de interesse. Dessa forma, a adição de 1 mM de ácido acetilsalicílico (AAS) em cultura de células de *Catharanthus roseus* por 72 h promoveu aumento no teor de alcalóides na ordem de 160%. Já, a incorporação

de 10 mM e 20 mM de AAS ao meio aumentou a concentração de furanocumarinas em 612% e de fenólicos em 1587%, respectivamente (Godoy & Loyola, 1997).

*Duboisia myoporoides* é fonte dos alcalóides tropânicos hiosciamina e escopolomina. Estudos realizados *in vitro* com essa espécie mostraram que calos e plântulas induzidos na presença de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) produziram os referidos alcalóides tropanos. Entretanto, a substituição de ANA por AIB, nas mesmas concentrações, inibiu a formação desses alcalóides em plântulas cultivadas em meio líquido (Khanam et al., 2000).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e/ou sua interação com as citocininas Tidiazuron (TDZ) e 6-benzilaminopurina (BAP) na calogênese em explantes foliares e radiculares de murici e identificar os principais metabólitos secundários presentes nos calos radiculares.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de murici coletadas no mês de fevereiro de 2006, a partir de plantas crescidas sob condições naturais, no município de Paraúna, estado de Goiás.

Após coleta dos frutos maduros, o epicarpo e mesocarpo foram removidos utilizando peneira e água corrente. A seguir, os endocarpos foram tratados com solução de Benomil a 2% (p/v) e, após secagem à temperatura ambiente, foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em câmara fria a temperatura controlada de 5°C, no escuro.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Quando demandado, os endocarpos foram desinfestados com solução de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo), por 10 min, e colocados para secar. A seguir, as sementes foram extraídas mediante quebra do endocarpo com auxílio de mini-morsa, segundo Reis (2001).

As sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 s, em seguida em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 20 min, enxaguadas em água destilada e autoclavadas por quatro vezes consecutivas. A seguir, foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% (p/v) de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. Os tubos foram tampados com tampas de polipropileno (Sigma Chem. Co., USA)

A menos que especificado, essa composição básica de meio foi utilizada em todas as fases desse estudo. Os meios foram solidificados com ágar granulado (Merck, Alemanha) a 0,7% (p/v) e o pH aferido para  $5,8 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem (121°C, 1,1 atm, 20 min).

A germinação ocorreu no escuro, sendo as plântulas após 15 dias, transferidas para o ambiente sob fotoperíodo de 16 horas.

#### **4.1. Indução de calos em explantes foliares de murici em função das concentrações de 2,4-D, TDZ ou BAP na presença ou ausência de luz.**

As plântulas obtidas a partir de germinação *in vitro* forneceram os explantes para esse experimento.

Segmentos foliares (0,5 cm<sup>2</sup>) foram inoculados em placas de Petri de poliestireno cristal (60 x 15 mm; J. Prolab, Brasil), contendo cada uma cerca de 15 ml de meio básico MS suplementado com 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), BAP ou TDZ (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). As placas foram vedadas com filme plástico de PVC (Goodyear, Brasil).

A incubação foi realizada no escuro e na luz com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 65 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fótons e temperatura de 27 ± 2°C.

A avaliação ocorreu após 45 dias da inoculação, observando-se a porcentagem da área do explante ocupada por calos. Após a avaliação, os calos foram transferidos para meio MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Os resultados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial com 4 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com cinco explantes.

#### **4.2. Efeito de concentrações de BAP combinadas ao 2,4-D na calogênese em explantes foliares em murici.**

As plântulas obtidas a partir de germinação *in vitro* forneceram os explantes para esse experimento.

Segmentos foliares (0,5 cm<sup>2</sup>) foram inoculados em placas de Petri de poliestireno cristal (60 x 15 mm; J. Prolab, Brasil), contendo cada uma cerca de 15 ml de meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D em combinação com concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). As placas foram vedadas com filme plástico de PVC (Goodyear, Brasil). A incubação foi realizada no escuro, à temperatura de 27 ± 2°C.

A avaliação ocorreu após 45 dias da inoculação, observando-se a porcentagem da área do explante ocupada por calos. Após avaliação os calos foram transferidos para meio MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Os resultados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial com 4 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com cinco explantes.

#### **4.3. Efeito de concentrações das citocininas BAP ou TDZ na calogênese em segmentos radiculares de murici.**

Segmentos radiculares (0,8 cm) foram inoculados em placas de Petri de poliestireno cristal (60 x 15 mm; J. Prolab, Brasil), contendo cada uma cerca de 15 ml de meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP ou TDZ (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). As placas foram vedadas com filme plástico de PVC (Goodyear, Brasil).

A incubação foi realizada na luz com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A avaliação ocorrerá após 45 dias da inoculação, e a intensidade de calo formado foi determinada utilizando-se uma escala de 1 a 4, onde: 1= ausência de calos; 2 = calo com pequeno tamanho (<1 cm); 3 = médio tamanho (1-1,5 cm) e 4 = calo grande (>1,5 cm) (Flores et al., 2000).

Os resultados foram submetidos à análise de variância com 5 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com cinco explantes.

#### **4.4. Triagem fitoquímica dos calos provenientes de segmentos radiculares de murici.**

Os calos provenientes do experimento anterior foram subcultivados e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio básico MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP ou TDZ, correspondente ao tratamento anterior, e 3% (p/v) de sacarose. O meio foi solidificado mediante a

inclinação dos tubos com 45° para aumentar a superfície de contato dos calos meio.

A incubação foi realizada na luz com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e sob duas irradiâncias [ $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons (Ir1)  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons (Ir2)]

As amostras foram coletadas nos períodos de 15 e 30 dias após o dia da inoculação, sendo que cada amostra apresentava 1 g de massa fresca. Posteriormente, esses calos foram liofilizados e submetidos aos testes fitoquímicos, que foram realizados no Núcleo de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As amostras foram submetidas às análises fitoquímicas preliminares para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários, de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997). Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram solubilizados em metanol e utilizados para identificação de alcalóides, antraquinonas, triterpenóides, esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos e flavonóides.

#### **4.4.1. Alcalóides**

Em uma placa de Elisa, 50  $\mu\text{l}$  da amostra foram colocados em três poços diferentes e 150  $\mu\text{l}$  de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcalóides (Reativo de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitado ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcalóides.

#### **4.4.2. Triterpenóides e Esteróides**

Em uma placa de Elisa, 150  $\mu\text{l}$  da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram acrescentados 1 gota de anidrido acético e 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada é indicativo da presença de esteróides e de cor vermelha, da presença de triterpenóides.

#### **4.4.3. Saponinas**

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e aproximadamente 2 ml da água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 min e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indica a presença de saponinas.

#### **4.4.4. Cumarinas**

A amostra foi gotejada em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, 1 gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. O aparecimento de fluorescência de cor azul-esverdeada após exposição à luz ultra-violeta (365 nm) indica a presença de cumarinas.

#### **4.4.5. Compostos fenólicos**

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de FeCl<sub>3</sub> 2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

#### **4.4.6. Taninos**

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e gota a gota, e posteriormente acrescentada uma gota de ácido clorídrico a 10% e solução de gelatina 2,5%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos totais.

#### **4.4.7. Antraquinonas**

Em uma placa de Elisa, 150 µl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram adicionados 50 µl de NaOH 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.

#### **4.4.8. Flavonóides**

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz UV 365 nm indica a presença de flavonóides.

#### **4.4.9. Determinação do conteúdo de fenólicos totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Denis (Duh & Yen, 1997). Uma solução estoque em metanol de cada amostra ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) foi preparada. Um ml desta solução foi misturado a 1 ml do reagente de Folin-Denis e 8 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em tampão NaOH 0,1N. A mistura foi agitada e após 60 min de incubação em banho-maria a  $30^\circ\text{C}$ , foi centrifugada a  $3000 \times g$ , por 1 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 730 nm. Alíquotas de 0,07 a 0,5 ml de uma solução de ácido tânico ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) (Vetec) foi utilizada para preparação da curva de calibração. O branco foi preparado com 1 ml de metanol, 8 ml de tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em NaOH 0,1N e 1 ml do reagente de Folin-Denis. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  amostra vegetal, em equivalente de ácido tânico (TAE).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à calogênese em explantes foliares de murici pelo uso de 2,4-D, diferenças significativas na área do explante coberta por calos foram encontradas em função da exposição à luz ou ao escuro, das concentrações de 2,4-D e da interação destes fatores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise de variância para calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) cultivados em presença de 2,4-D.

Fonte de variação	G.L	QM
		Área do explante coberta por calos (%)*
2,4-D	3	31942,9*
Luminosidade	1	3422,5*
2,4-D x luminosidade	3	32477,1*
Erro	152	308,0
Total	159	

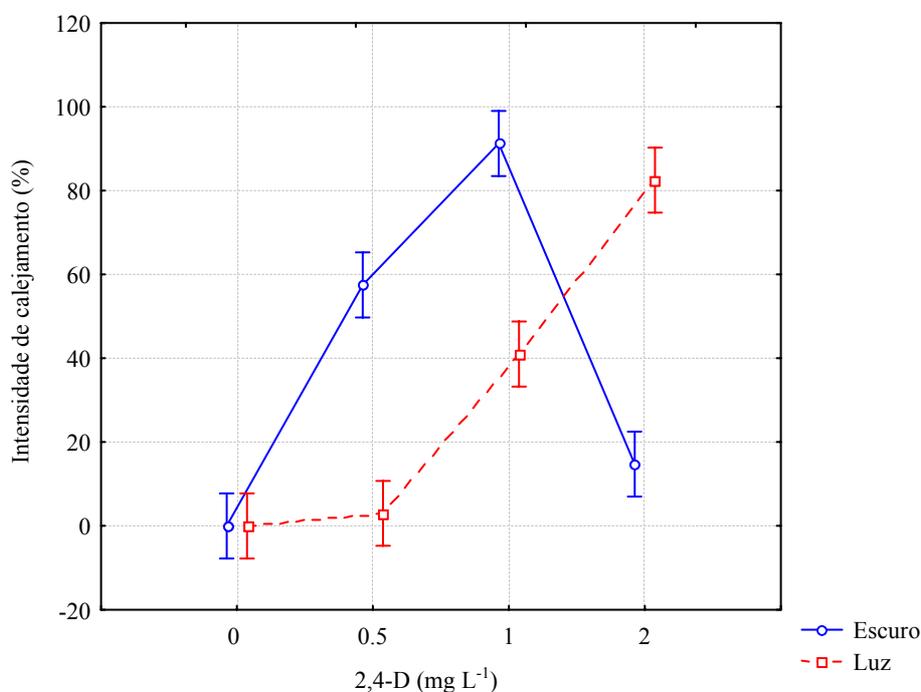
\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Na luz houve uma tendência linear crescente nas médias de área coberta por calos, sendo que o controle e a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> apresentaram as menores médias de área coberta por calo (menos de 3%). Ao contrário das concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> que forneceram valores acima de 40%. A maior média obtida foi de 82,5% para o nível de 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Na ausência de 2,4-D não houve formação de calos (Figura 1).

Nos tratamentos conduzidos sob escuro, a dose de 1,0 mg L<sup>-1</sup> apresentou a maior porcentagem de área coberta por calos (91,25%), enquanto que o menor valor foi da dose de 2,0 mg L<sup>-1</sup> (14,75%) (Figura 1). Quanto à coloração e consistência, os calos formados no escuro apresentaram cor branca e aspecto friável. Já os incubados em condição de luz apresentaram setores avermelhados (Figura 5).

Completados 30 dias em que os calos obtidos nesse experimento foram subcultivados em meio MS, na ausência de reguladores de crescimento, foram observadas mudanças no aspecto e coloração dos calos. Os calos mantidos em presença de luz tenderam a oxidar e apresentaram aspecto compacto com formação de regiões nodulares. Já os que foram mantidos no escuro, evoluíram

da coloração branca para amarela com aspecto friável. Ainda, observou-se a diferenciação de raízes nos calos derivados dos meios com 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; para os demais não foi observado a formação de nenhuma estrutura (Figura 8).



**Figura 1.** Porcentagem da área do explante foliar de murici (*Byrsonima verbascifolia*) ocupada por calos em resposta a concentrações de 2,4-D, na luz e no escuro.

F(3,152) = 105, 44

Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.

As auxinas são muito empregadas na indução de calos friáveis e sua concentração no meio variam de 0,01 a 10 mg L<sup>-1</sup>, sendo bastante empregado o 2,4-D com reconhecido efeito de supressão da morfogênese (Ammirato, 1983). Daí sendo comum a indução dos calos em meio com auxina e depois sua retirada do sistema para a obtenção de regenerantes. Esse fato foi observado nesse experimento com a rizogênese em calos cultivados no escuro.

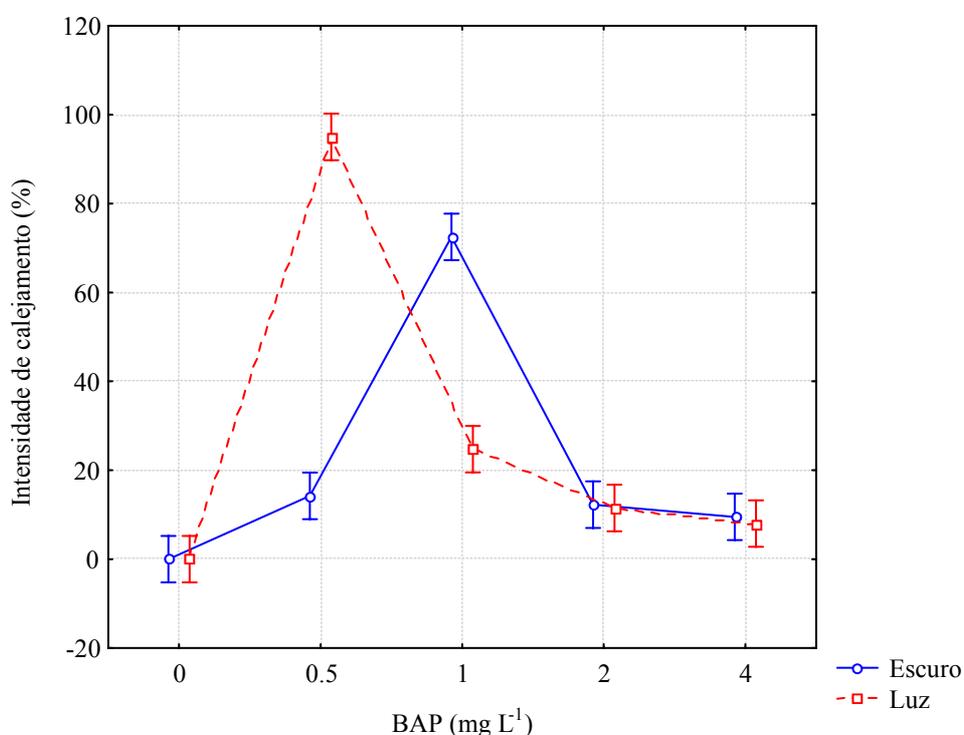
Quanto ao uso do BAP na indução de calos diferenças significativas na área do explante coberta por calos foram encontradas em função da exposição à luz ou ao escuro, das concentrações de BAP e da interação destes fatores (Tabela 2). Na presença de luz, o resultado mais satisfatório foi o de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP,

com 95% de cobertura de calos. No escuro a maior porcentagem foi obtida com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionando 72% de área coberta por calos (Figura 2).

**Tabela 2.** Análise de variância para calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) inoculados em presença de BAP.

Fonte de variação	GL	QM
BAP	4	24968,6*
Luminosidade	1	1891,1*
BAP x Luminosidade	4	21535,8*
Erro	190	140,8
Total	199	

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.



**Figura 2.** Porcentagem da área do explante foliar de murici (*Byrsonima verbascifolia*) ocupada por calos em resposta a concentrações de BAP, na luz e no escuro.

F(4,190) = 152,93

Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.

Observou-se que os níveis mais baixos desse regulador proporcionaram maiores intensidades de calejamento, e que a luz intensificou o processo. Os calos obtidos apresentaram coloração branca à amarelada, sendo que na presença de luz foram observados alguns setores avermelhados (Figura 5).

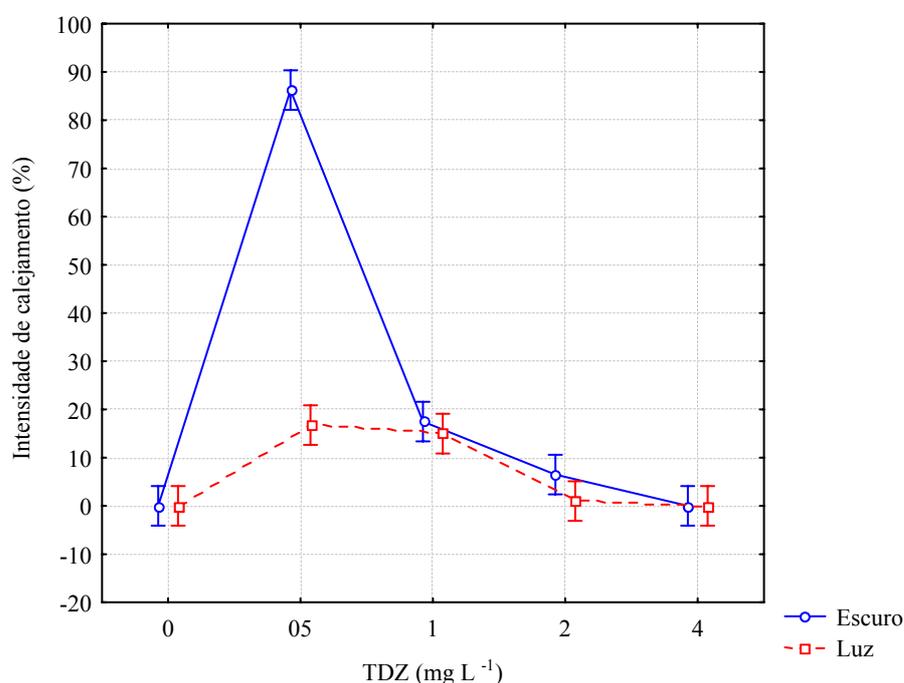
Quanto ao uso do TDZ, também se observou diferenças significativas entre os fatores avaliados (Tabela 3). Na presença de luz as menores médias de calojamento, com porcentagem máxima de 16,75% em 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Já no escuro, no mesmo nível desse regulador, obteve-se 86,25% de área coberta por calos, o que demonstra que a luz parece prejudicar o processo de indução de calos utilizando-se o TDZ como regulador de crescimento (Figura 3).

Tanto na presença quanto na ausência de luz não houve formação de calos nas concentrações mais elevadas utilizadas no experimento.

**Tabela 3.** Análise de variância para calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) inoculados na presença de TDZ.

Fonte de variação	GL	QM
		Área do explante coberta por calos (%)*
TDZ	4	19079,25*
Luminosidade	1	12012,50*
TDZ x Luminosidade	4	9163,75*
Error	190	86,67
Total	199	

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.



**Figura 3.** Porcentagem da área do explante foliar de murici (*Byrsonima verbascifolia*) ocupada por calos em resposta a concentrações de TDZ, na luz e escuro.

$F(4,190) = 105.73$

Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.

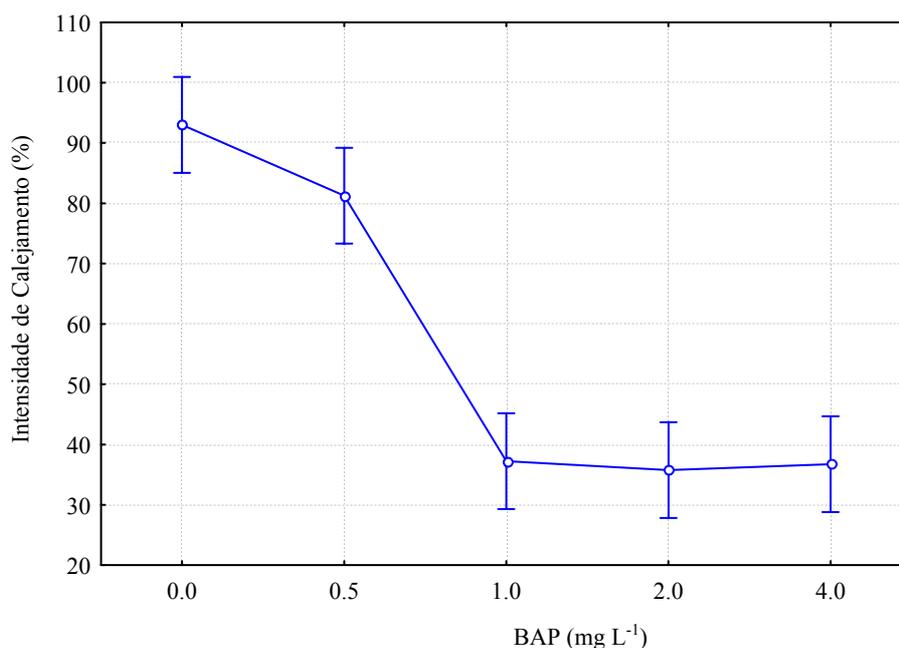
O TDZ pertence à classe das tiadiazoluréias e sua atividade como regulador de crescimento foi demonstrada, pela primeira vez, em cultura de calo de *Phaseolus lunatus* cv. Kingstom (Mok et al., 1982). O TDZ não só estimulou a proliferação de calos, como também superou a atividade citocinínica das demais tiadiazoluréias testadas.

Esse regulador também tem sido usado em micropropagação, pois é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0  $\mu\text{M}$  (Huetteman & Preece, 1993). Para a espécie medicinal *Tylophora indica*, esse regulador foi eficiente em promover a organogênese indireta em calos induzidos a partir de explantes foliares (Thomas & Philip, 2005). Esse composto tem mostrado grande capacidade em estimular a formação de gemas, principalmente em espécies que mostram baixa eficiência organogênica quando cultivadas em meio com adição de citocininas comumente usadas em cultura *in vitro* (Mante et al., 1989; Dolcet-Sanjuan et al., 1991; Gribaudo e Fronda, 1991; Preece et al., 1991; Huetteman e Preece, 1993; Lima e Gonçalves, 1998).

Husaini et al. (2007) obtiveram tanto embriogênese somática quanto organogênese em explantes foliares de *Fragaria ananassa* mediante o uso de TDZ. A organogênese máxima foi obtida quando as folhas foram cultivadas em sua menor concentração testada (9,08  $\mu\text{M}$ ).

O TDZ é mais estável e resistente às oxidases, sendo biologicamente mais ativo em baixas concentrações quando comparado às citocininas derivadas da adenina, como BAP e zeatina, na maioria das espécies em que foi testado, particularmente em espécies lenhosas (Kefford et al., 1968; Einset & Alexander, 1984; Mok & Mok, 1985; Van Nieuwkerk et al., 1986; Lu, 1993; Lima & Gonçalves, 1998).

Quanto ao efeito do BAP combinado ao 2,4-D, os resultados demonstram uma redução na porcentagem da área do explantes coberta por calos à medida que se aumentava a concentração de BAP (Figura 4).



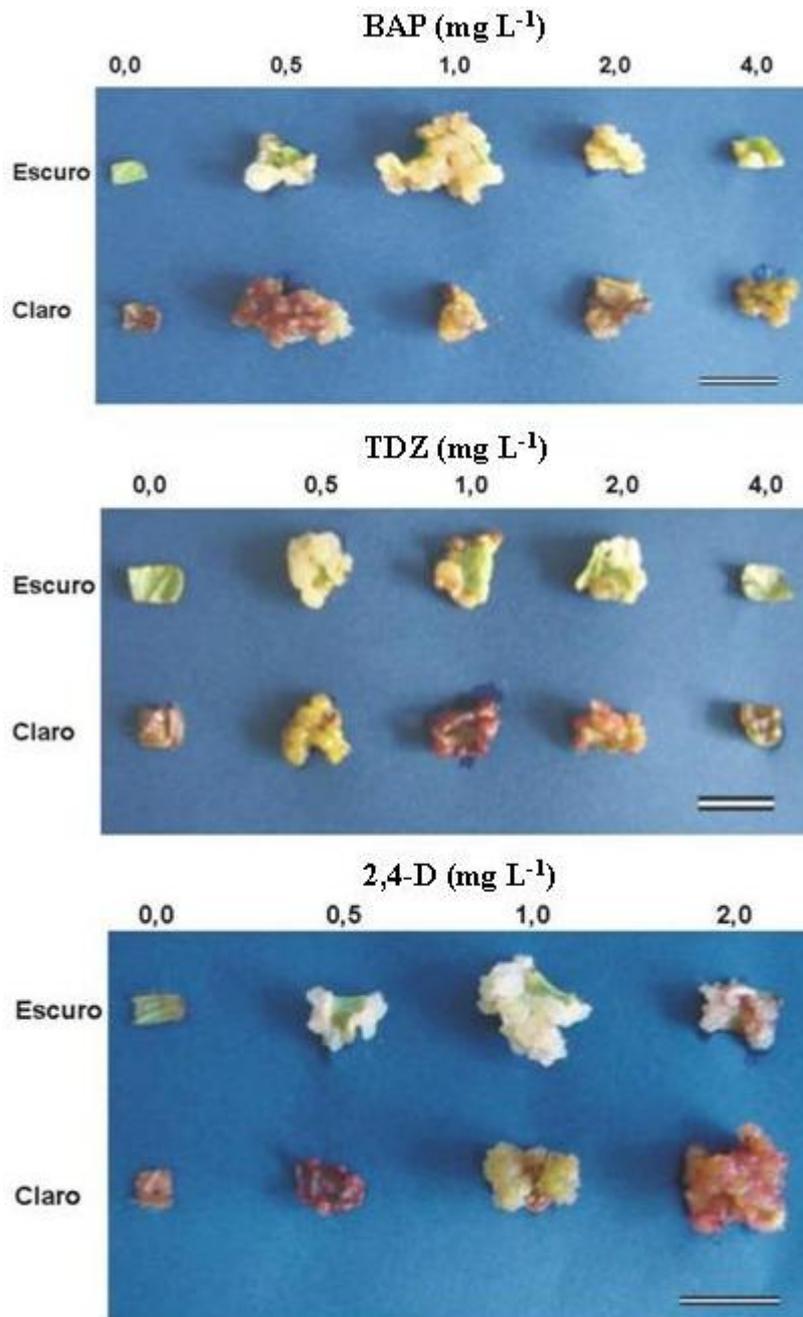
**Figura 4.** Porcentagem da área do explante foliar de murici (*Byrsonima verbascifolia*) ocupada por calos em resposta a concentrações de BAP, combinadas com 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, no escuro.

F(4,95) = 48,969

Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nogueira et al. (2007), trabalhando com calogênese em explantes foliares de *Byrsonima intermedia*, onde foi observado que o 2,4-D, associado ao BAP, proporcionou redução na área do explante coberta por calos à medida que se aumentava a concentração de BAP. Pode se inferir que o BAP presente no meio, interagindo com a citocinina endógena do explante, proporcionou elevada concentração em relação à auxina, levando à redução da ocorrência de calos (Nogueira et al., 2007).

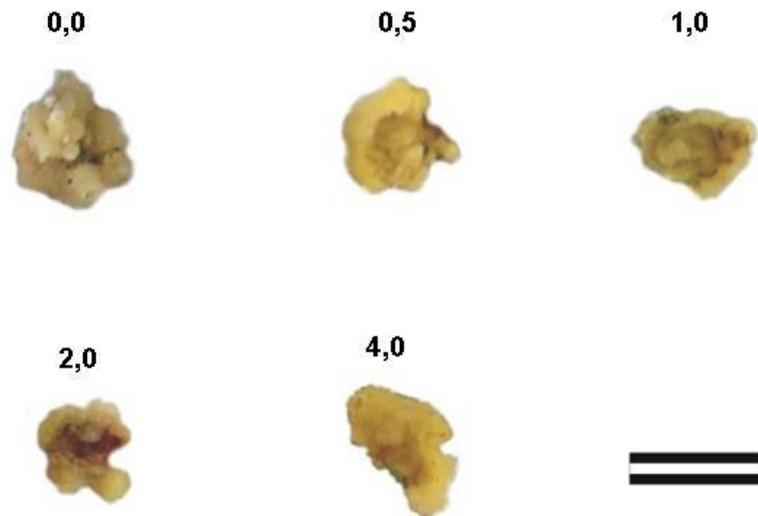
Na indução de calos e regeneração de plantas a partir de diferentes explantes em *Withania somnifera*, em meio MS com combinações de 2,4-D e cinetina, observou-se a máxima formação de calos (100%) em raízes e cotilédones, em meio acrescido de 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (Gita Rani, 2003).



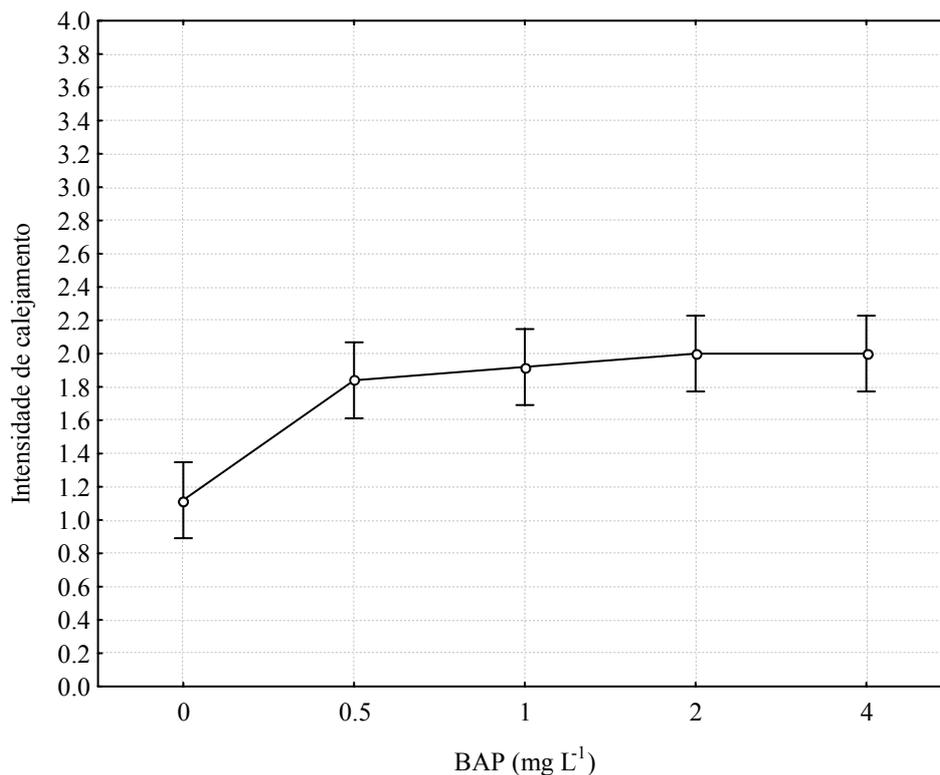
**Figura 5.** Aspecto da calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta a diferentes concentrações de BAP, TDZ e 2,4 D na Luz e no escuro. Barras = 1 cm.

Os calos nesse experimento apresentaram coloração amarelada, à exceção dos calos obtidos na ausência de BAP que apresentaram cor branca (Figura 6).

Quanto ao uso do BAP na indução de calos em explantes radiculares de murici, observou-se que as médias dos tratamentos não diferiram entre si, mas apenas do controle. Porém, houve tendência de incremento dos valores médios à medida que se aumentavam os níveis da citocinina (Figura 7).



**Figura 6.** Aspecto da calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta a diferentes concentrações de BAP combinados a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, no escuro. Barra = 1 cm.



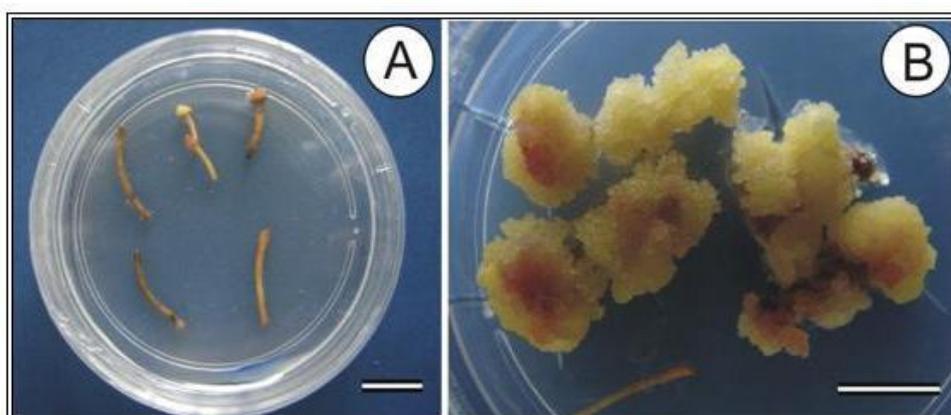
**Figura 7.** Intensidade de calejamento em explantes radiculares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta à concentrações de BAP.  
 $F(4,120) = 10,458$   
 Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.

Os calos apresentaram coloração amarela com algumas regiões avermelhadas e, com frequência, cobriram todo o explante (Figura 9).

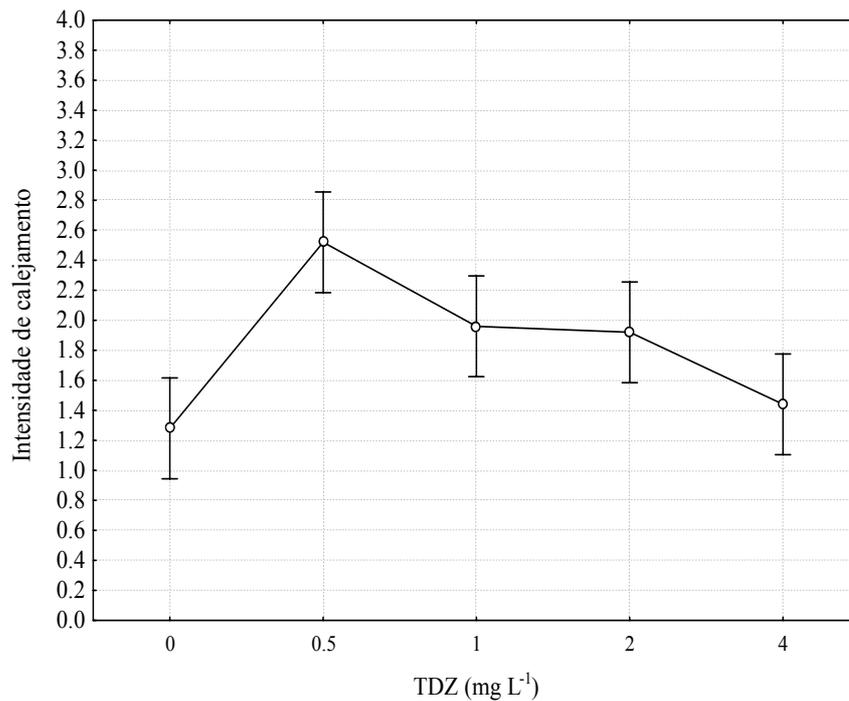
Quanto ao uso do TDZ, observou-se que os maiores valores médios para o menor nível ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Nesse caso, os calos apresentaram de coloração amarela com regiões avermelhadas, diferenciando-se apenas a partir das extremidades do explante (Figura 11).



**Figura 8.** Aspecto da calogênese em explantes foliares de murici (*Byrsonima verbascifolia*), induzida com 2,4-D, 30 dias após transferência para meio sem regulador de crescimento. A - Calos cultivados em presença de luz, apresentando aspecto compacto com estruturas nodulares. B - Calos cultivados no escuro, apresentando coloração amarelada e formação de raízes. Barra = 0,5 cm.



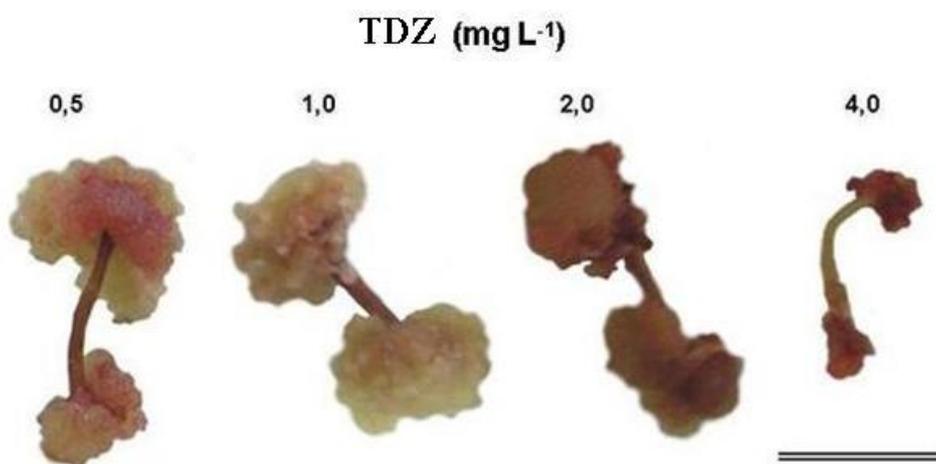
**Figura 9.** Aspecto da calogênese em explantes radiculares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta a diferentes concentrações de BAP. A - controle; B - calos friáveis obtidos mediante cultivo com  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Barras = 1,0 cm.



**Figura 10.** Intensidade de calejamento em explantes radiculares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta a concentrações de TDZ.

$F(4,120) = 8,3098$

Barras verticais indicam os intervalos de confiança em 0,95.



**Figura 11.** Aspecto da calogênese em explantes radiculares de murici (*Byrsonima verbascifolia*) em resposta a diferentes concentrações de TDZ. Barra = 1,0 cm.

Em *Salix humboldtiana*, 90% de calos friáveis foram obtidos em explantes foliares utilizando-se 6,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. A utilização de concentração isolada de ANA ou BAP, além de induzir a formação de calos, também proporcionou a rizogênese (Santos, 2005). Em segmentos foliares de ingazeiro

(*Inga vera* subsp. *affinis*), Soares (2003) constatou que na ausência de luz, as concentrações de 1,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D proporcionaram os maiores resultados com 90 e 80% de cobertura dos explantes por calos, respectivamente.

Bonilla (2002), trabalhando com tangará-açú (*Rudgea viburnoides*) observou que a dose de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, na ausência de luz, induziu maior calogênese em explantes foliares, enquanto que o ANA foi eficiente somente em explantes caulinares e em presença de luz.

Em genótipos de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, comparativamente ao BAP e ANA, apenas o 2,4-D foi eficiente em promover calogênese, havendo genótipo-especificidade para essa resposta morfogênica (Obukosia et al., 2005). Todavia, na indução de calos nodulares embriogênicos a partir de explantes radiculares da espécie medicinal *Psoralea coryfolia* L foi necessária a combinação de ANA ou 2,4-D e BAP (Chand & Sahrawat, 2002).

Kielse et al. (2007), trabalhando com diferentes explantes de *Parapiptadenia rigida*, obtiveram os melhores resultados de formação calogênica com as combinações de 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg L<sup>-1</sup> Kin e 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> Kin em segmentos de hipocótilo, atingindo 8,21 e 7,84%, respectivamente

Nesse trabalho, foi realizada a triagem fitoquímica dos calos provenientes de segmentos radiculares. Para aqueles tratados com BAP, sob a Ir2 (150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), não foi observada proliferação. Por esse motivo, não constam dos resultados da triagem fitoquímica. Provavelmente, esse nível de irradiância interferiu na atividade do regulador de crescimento.

Os resultados da triagem fitoquímica (Tabela 4) indicam que, indiferente do tratamento utilizado, estão presentes fenóis, taninos e triterpenóides. Flavonas, flavonóis e xantonas foram encontradas apenas nas amostras com 15 dias de cultivo, independente do regulador de crescimento utilizado. Saponinas aparecem apenas nos calos com 30 dias de cultivo em meio suplementado com TDZ, sob irradiância Ir 2 (150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e cumarinas sob Ir1 (65 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os níveis de fenóis praticamente não diferiram para os calos cultivados em meio com BAP. Porém, maiores níveis de fenóis foram obtidos em meio adicionado de TDZ, para a Ir2 e aos 30 dias de cultivo (Figura 12).

Análises fitoquímicas em plantas de *Byrsonima verbascifolia* revelaram a presença de triterpenóides em sua casca e, taninos, flavonóides e triterpenos nas folhas (Lorenzi & Matos, 2002). Também foram encontrados de 15 a 20% de taninos em sua casca. Do extrato clorofórmico da casca, obtiveram-se triterpenos, dentre eles acetato triterpênico (Fernandes et al., 1982).

Trabalhando com fitoquímica dos calos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia*, Nogueira et al. (2003) observaram que não houve diferença considerável nos teores de taninos entres as fases linear e estacionária do cultivo.

Castro et al. (2003) relataram a presença de fenóis, em especial taninos nas folhas de *Byrsonima verbascifolia*. Em estudo fitoquímico constatou-se que os níveis de fenóis totais permanecem constantes nas plantas indiferente da estação, e que as modificações nos teores de taninos totais não estão, necessariamente, associadas às alterações nos níveis dos fenóis totais.

De fato, a presença marcante de taninos detectada (Tabela 1) é coerente com a ampla utilização da espécie, por exemplo, para o beneficiamento de couro em curtumes. Os taninos não se definem propriamente pela composição química, que é muito variável, mas pelas propriedades dos compostos fenólicos. Eles estão relacionados com a propriedade de adstringência, que envolve a precipitação das proteínas; são utilizados como antidiarréicos, antimicrobianos, antivirais, hipoglicemiantes e antiespasmódicos. Nas células vegetais, os taninos ocorrem separadamente das proteínas e enzimas citoplasmáticas, dissolvidos dentro de vacúolos (Castro et al., 2004).

Os flavonóides ocorrem como misturas, sendo muito raro encontrar somente um simples componente flavonóide no tecido vegetal. São indicados como antiinflamatórios, antivaricosos, diuréticos, antiviróticos, antioxidantes e antimicrobianos (Castro et al., 2004).

Um exemplo importante desse tipo de estudo é o de *Catharanthus roseus*, cujos alcalóides indólicos, vinblastina e vincristina, são importantes no tratamento de câncer e a ajmalcina é utilizada no tratamento de doenças relacionadas ao sistema circulatório. As duas primeiras substâncias são

encontradas na planta em baixas concentrações (0,0005%). A rota metabólica é longa, com mais de 20 passos envolvendo diferentes enzimas, sendo a produção desses metabólitos por síntese até o momento é inviável. A produção de células em suspensão em larga escala tem sido apontada como solução viável para contornar o problema de baixa produtividade de vinblastina, vincristina, assim como de outras substâncias de interesse farmacológico (Dicosmo & Misawa, 1995).

Estudos realizados *in vitro* com células de *Podophylum hexandrum*, *P. pelpatum*, *Linum flavum*, *L. nodiflorum* e *L. album* são promissores e mostraram o potencial de células em suspensão de produzirem até 0,7% de podofilotoxina (Empt et al., 2000).

*Duboisia myoporoides* é fonte de alcalóides tropânicos (hiosciamina e escopolomina). Estudos realizados *in vitro* com essa espécie mostraram que calos e plântulas induzidos na presença de BAP e ANA produziram essa classe de compostos. Entretanto a substituição de ANA por IBA, nas mesmas concentrações, inibiu a formação de hiosciamina e escopolomina em plântulas cultivadas em meio líquido (Khanam et al., 2000).

Até bem recentemente, pesquisas mostravam que células indiferenciadas não eram capazes de produzir óleo essencial, uma vez que os calos não produzem estruturas secretoras como os tricomas, nem tão pouco unidades de reservas capazes de armazenar substâncias tóxicas. Entretanto, experimentos com adição de homogenatos de fungos promoveram acúmulo de óleo essencial (0,39 g L<sup>-1</sup>) em calos de *Mentha piperita*; além disso, a temperatura afetou diretamente essa produção, onde a redução de 27 °C para 10 °C, por um período de 6 horas, elevou a quantidade de óleo para 0,53 g L<sup>-1</sup>. (Dornenburg & Knorr, 1996).

Estudos com *Rauwolfia sellowii* mostraram que a cultura de células em suspensão foi capaz de acumular, no final do estágio de crescimento, alcalóides que são encontrados na planta intacta, sendo a sellowina encontrada como composto majoritário nas células cultivadas *in vitro* (Rech et al., 1998). Abdullah et al. (1998) trabalharam com *Morinda elliptica*, uma Rubiaceae nativa da Malásia que produz antraquinonas com atividade bactericida, fungicida e anti-

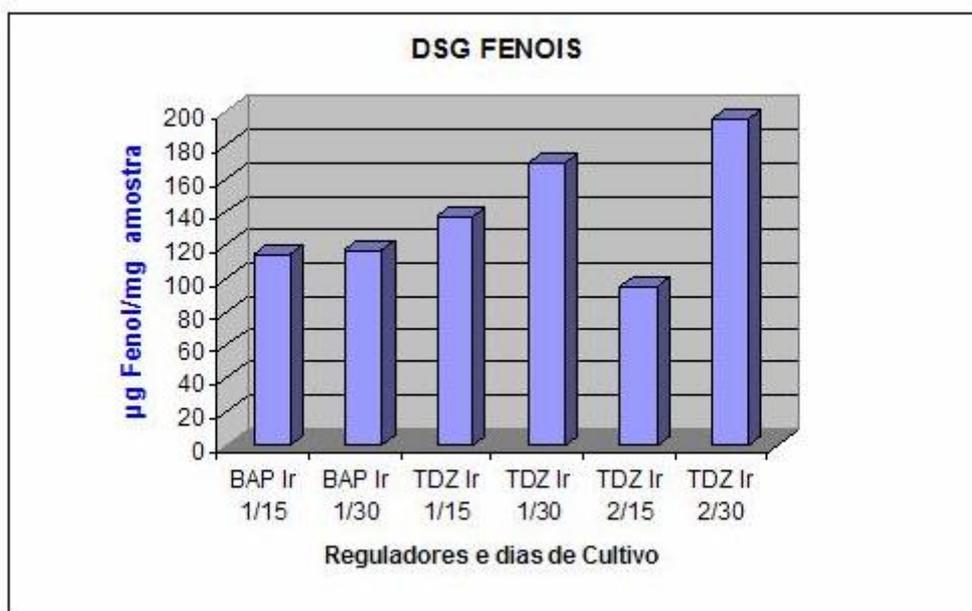
leucêmica. A cultura de células em suspensão foi estabelecida na presença de ANA e cinetina e ao crescer em meio suplementado com alta concentração de sacarose (5-6%) produziu elevado acúmulo de biomassa (24 g L<sup>-1</sup>). Entretanto níveis ainda maiores de sacarose (8%) foram necessários para obter a máxima concentração de antraquinona (6,4 mg L<sup>-1</sup>). Resultado semelhante foi obtido com *Carthamus tinctorius*, uma planta medicinal da Ásia, cuja cultura de células em suspensão quando realizada com elevada concentração de sacarose (10%) promoveu o máximo acúmulo dos metabólitos de interesse (Gao et al., 2000).

O efeito da radiação sobre a produção de metabólitos secundários tem sido observado em muitos trabalhos. A radiação ultravioleta pode aumentar a produção de cumarinas, esse processo teria importância na proteção das células contra a penetração dessa radiação e na proteção contra microrganismos (Zobel & Brown, 1993).

**Tabela 4.** Triagem fitoquímica de calos de murici (*Byrsonima verbascifolia*), em função do regulador de crescimento (BAP ou TDZ), período de cultivo e irradiâncias.

Classe se constituintes	BAP Ir 1/15	BAP Ir 1/30	TDZ Ir 1/15	TDZ Ir 1/30	TDZ Ir 2/15	TDZ Ir 2/30
Fenóis	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	+	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
Esteróides	-	-	-	-	-	-
Triterpenóides	+	+	+	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-	-	-

**Ir 1** = Irradiância de 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; **Ir 2** = Irradiância de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .  
**15** = Período de 15 dias de cultivo; **30** = Período de 30 dias de cultivo.



**Figura 12.** Níveis de fenóis em calos de murici (*Byrsonima verbascifolia*) cultivados *in vitro*, em função do regulador de crescimento, irradiâncias e períodos de cultivo. **Ir 1** = Irradiância de  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; **Ir 2** = Irradiância de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **15** = Período de 15 dias de cultivo; **30** = Período de 30 dias de cultivo.

Mantovani (2007), observou as mais altas frequências calogênicas em discos foliares de Ginkgo, cultivadas em meio MS com a combinação de ANA  $4,4 \mu\text{M}$  e BAP  $0,4 \mu\text{M}$  (100%), sendo a produção máxima de massa fresca de calos obtida com o carboidrato sacarose e na ausência de luz. Quanto à avaliação da produção de metabólitos secundários nos calos, o autor constatou que a condição de cultivo contribuiu para a não produção, ou não detecção destes metabólitos em calos de Ginkgo.

Os resultados indicam que o 2,4-D proporcionou os melhores respostas na indução de calos em explantes foliares. Em explantes radiculares observou-se formação de calos em todos os tratamentos, incluindo o controle. O estudo fitoquímico indicou a presença de vários compostos, dentre eles, fenóis, taninos e triterpenóides. Os níveis de fenóis praticamente não diferiram para os calos cultivados em meio com BAP. Porém, para o TDZ, observam-se os maiores níveis desses compostos na Ir2 e período de 30 dias de cultivo.

O protocolo de indução de calogênese estabelecido, de modo especial a partir de explantes radiculares, permite a condução de futuros trabalhos envolvendo a produção de cultura de células em suspensão para estudos da cinética de crescimento celular, a avaliação da produção de metabólitos a partir desse sistema em função de diferentes condições de estresse impostas às células, bem como a obtenção de extratos a partir de calos e/ou suspensão de células para sua avaliação em diversos modelos biológicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.A.; ALI, A.M.; MARZIAH, M.; LAJIS, N.H.; ARIFF, A.B. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54:173-182, 1998.

ALMEIDA, S.P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464p, 1998.

ANDRADE, M.W. de; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24(1):174-180, 2000.

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: CHRISTIAN, W.; CARSON, M. (Eds.). *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century*. Kerala: Research Signpost, p. 303-333, 2004.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 44:169-176, 1996.

BONILLA, M. G. O. Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth. Tese de Doutorado em Fitotecnia-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 126p. 2002.

BRISKIN, D. Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*, v.124, p.507-514, 2000.

CASTRO, A.H.F.; ALVAREGA, A.A.; PAIVA, R.; GOMES, G.A.C.; ALCÂNTARA, E. Propagação do murici (*Byrsonima intermedia* ex A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinais. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. 2. ed. Visconde do Rio Branco: 113p. 2004.

CHAND, S.; SAHRAWAT, A.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root segments of *Psoralea corylifolia* L., an endangered medicinally important plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38:33-38, 2002.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J.F.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69:1269-1271, 1992.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHERIO, A. L.; FONSECA, E.P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. *Scientia Forestalis*, 71:19-24, 2006.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: *Micropropagation - Technology and Application*. DEBERGH, P.C.; ZIMMERMANN, R.H. (Eds.). Kluwer Dordrecht: Academic Publishers, p. 3-13, 1991.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13(3):425-453, 1995 .

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). *Plant Cell Reports*, 10: 240-242, 1991.

DORNENBURG, H; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Science*, 15:141-168, 1996.

DUBLIN, P. Embryogénese somática directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. *Café Cacao Théobroma*, 25(4):237-242, 1981.

DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embriogénese somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. *Café, Cacao Théobroma*, 24(2):121-130, 1980.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao Théobroma*, 28(4):231-244, 1984.

DUH, P.-D.; YEN, G.-C. Antioxidative activity of three water extracts. *Food Chemistry*, 60:639-645, 1997

EINSET, J.W.; ALEXANDER, J.H. Multiplication of *Syringa* varieties and species in tissue cultures. *Combined Proceedings of the International Plant Propagation Society*, 34:628-636, 1984.

EMPT, U.; ALFERMANN, W.; PRAS, N.; PERSEN, M. The use of plant cell Cultures for the production of podophyllotoxin and related ligninas. *Journal of Applied Botany – Angewandte Botanik*, 74:145-150, 2000.

FELISMINO, D.C. Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica in vitro de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 124p., 2005.

FERNANDES, J.B.; VIERIA, P.C.; BROCKSON, U. Triterpenos de *Byrsonima verbascifolia*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira pra o Progresso da Ciência, 34, 1982, Campinas, SP. Resumos. Campinas: SBPC/UNICAMP, p. 488, 1982.

FERREIRA, M.G.R; CÁRDENAS, F.E.N; CARVALHO, C.H.S; CARNEIRO, A. A; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de Auxinas e do Meio Líquido. Revista Brasileira de Fruticultura, 23(3):473-476, 2001.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 8(3):89-95, 2006.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50:151-158, 1968.

GAO, W.Y.; FAN, L.; PAEK, K.Y. Yellow and red pigment production by cell cultures of *Cathamus tinctorius* in a bioreactor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60:95-100, 2000.

GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology. 2.ed. Somerset: Exegetics. p.37-66, 1993.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture: 2.ed. part 2 in practice. Somerset: Exegetics. p.575-638, 1996.

GODOY, H. G.; LOYOLA, V.V.M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. Plant Cell Reports, 16:287-290, 1997.

GOVIDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 26:1424-1427, 2003.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. HortScience, 26:1083, 1991.

HUSAINI, A.M.; ABDIN, M.Z. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43:576–584, 2007.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33:105-119, 1993.

KEFFORD, N. P.; ZWAR, J. A.; BRUCE, M. I. Antagonism of purine and urea cytokinin activities by derivatives of benzylurea, In: WIGHTMAN, E. & SETTERFIELD, G. (Eds.). *Biochemistry and physiology of plant growth substances*. OTTOWA: Runge Press, p.61-69, 1968.

KHANAM, N.; KHOO, C.; KHAN, A.G. Effect of cytokinin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62:125-133, 2000.

KIELSE, P.V.N; FRANCO, E.T.H; FRASSETTO, E.G. Indução de Calogênese em Explantes de *Parapiptademia rigida*. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(supl. 2):84-86, 2007.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; BUENO FILHO, F.S.S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de Pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24:56-63, 2000.

LIMA, M.M. DE; GONÇALVES, A.N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. *Scientia Forestalis*, 53:49-56, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagation Society*, 30:421-327, 1980.

LORENZI, H. 1998. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2ª. ed. Nova Odessa. Ed. Plantarum EDUSP, 207p., 1976.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 29:92-96, 1993.

MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19:10-11, 1989.

MANTOVANI, N. C. Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L. Tese (Doutorado em Botânica) - UFV. Viçosa, 149p., 2007.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Ciência Florestal*, 11(2):93-101, 2001.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. *Ciência Florestal*, 9(1):47-61, 1999.

MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental, EUFC, Fortaleza, Brazil, 1997.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN-BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. *Food Chemistry*, 85:231-237, 2004

MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [14C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Plant Physiology*, 65:427-432, 1985.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMATO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-urea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 21:1509-1511, 1982.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, 22:1194-1197, 1987.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. *Revista Brasileira de Agrociência*, 5(3):174-177, 1999.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.

NADER, W.; MATEO, N. Biodiversity-resource for new products, development and self reliance. In: Barthlott, W. & Winiger, M. Biodiversity – A challenge for development research and policy. Springer, Berlin, p.121-126, 1998.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SILVA, D.P.C.; SOARES, F.P.; ALBERT, L.H. de B.; PAIVA, P.D. de O. Efeito de thidiazuron (TDZ) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Anais do XIV Congresso Brasileiro de*

Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 324, 2003d.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SILVA, D.P.C.; SOARES, F.P.; ALBERT, L.H. de B.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia, 31(2):366-370, 2007.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; VIEIRA, C.V.; CASTRO, A.H.F.; SANTOS, B.R.; ALVARENGA, A.A. Efeito de diferentes meios de cultura, presença de sacarose e tipo de explantes na germinação *in vitro* de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003a.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; NAVES, V.C.; MARTINOTTO, C.; ABBADE, L.C. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2003c.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; SILVA, D.P.C.; CASTRO, A.H.F.; SANTOS, B.R.; ALBERT, L.H. de B.; ALVARENGA, A.A. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 325, 2003b.

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 15, 1993, Montpellier. Annales... Paris: ASIC, p. 73-81, 1993.

OBUKOSIA, S.D.; KIMANI, E.; WAITHAKA, K.; MUTITU, E.; KIMANI, P.M. Effects of growth regulators and genotypes on *Pyrethrum* *in vitro*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41:162-166, 2005.

PEREIRA, D.B.D. Micropropagação e estudos morfo-anatômicos do endocarpo, sementes e plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) - UnB. Brasília, 151p., 2002.

PIERIK, R.L.M. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publisher, 344p. 1987.

PIERSON, E.S.; van LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N.; STARITSKY, G. In vitro development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. Protoplasma, 115:208-216, 1983.

PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C.; ROTH, P.L. Micro-and cutting propagation of Silver maple: 1- results with adult and juvenile propagules. The American Society for Horticultural Science, 116:142-148, 1991.

RECH, S.B.; BATISTA, C.V.F.; SCHRIPEMA, J.; VERPORTE, R.; HENRIQUES, A.T. Cell culture of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54:61-63, 1998.

REINERT, J. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue, and organ culture: Berlin: Springer-Verlag, 803p. 1977.

REIS, L.B. Morfogênese *in vitro* de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. Dissertação de Mestrado, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa-UFV, 2001, 89p.

RIBEIRO, J.F.; PROENÇA, C.E.B.; ALMEIDA, S.P. Potencial frutífero de algumas espécies frutíferas nativas dos cerrados. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Brasília, Anais v.2, p.491-500, 1986.

RIBEIRO, J.F.; SILVA, J.A., FONSECA, C.E.L. da. Espécies frutíferas da região do cerrado. In: DONADIO, L.C. (Coord.) Fruticultura tropical. Jaboticabal: FUNEP, 268p. 1992.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. 1976. Botânica econômica brasileira. EPU-EDUSP, São Paulo. 1976.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18:91-120, 2000.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura, 28(2):293-296, 2006.

SANTOS, B.R; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C; PAIVA, P. D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). Ciência Rural, 35(3):510-514, 2005.

SANTOS, B.R., PAIVA, R., MARTINOTTO, C., AZEVEDO, K.S., NOGUEIRA, R.C., NICIOLI, P.M. Germinação *in vivo* e *in vitro* de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 234, 2003a.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; NAVES, V.C.; OLIVEIRA, L.M. Indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de

Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 305, 2003c.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, L.V. Efeito da ausência e presença de luz na indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, p. 303, 2003b.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. de; SOUZA, V.C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. Cerne, 7(2):117-123, 2001.

SILVA, D.B., SILVA, J.A., JUNQUEIRA, N.T.V., ANDRADE, L.R.M. Frutas do cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 178 p. 2001.

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. Zeitschrift Pflanzenphysiology, , 81(Supplement):395-408, 1977.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. Botânica Sistemática. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal.; 3.ed. – Porto Alegre: Atmed, 719p. 2004.

THOMAS, T.D.; PHILIP, B. Thidiazuron-induced high frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of a medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm. F.) Merrill. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41:124-128, 2005.

VAN NIEUWHERK, J. P.; ZIMMERMAN R. H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. HortScience, 21:516-518, 1986.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). Acta Amazônica, 34(4):507–511, 2004.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: Borém, A. (ed.). Biotecnologia Florestal. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, p.53-74, 2007.

YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiology, 26:595-597, 1985.

ZOBEL, A.M.; BROWN, S.A. Influence of low-intensity ultraviolet radiation on extrusion of furanocoumarins to the leaf surface. *Journal of Chemical Ecology*, 19:939-952, 1993.

## CONCLUSÕES GERAIS

O murici apresenta plasticidade foliar, uma que as estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* diferem das *in vitro* em vários fatores, como: espessamento do parênquima clorofiliano, frequência e ocorrência de estômatos, grau de desenvolvimento do sistema vascular, etc.

Os testes histoquímicos revelaram a presença de idioblastos com compostos fenólicos no parênquima de preenchimento, além disso, também foram positivos em algumas fibras internas aos feixes e para as células do parênquima paliçádico.

Na ausência de reguladores de crescimento na composição do meio de cultura não há formação de calos nos explantes foliares.

Dos três reguladores de crescimentos, o menos eficiente na indução de calos em explantes foliares foi o TDZ na presença de luz.

O 2,4-D proporcionou a maior média de área foliar coberta por calos na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  desse regulador no escuro. Estes quando transferidos pra meio desprovidos de reguladores respondeu com rizogênese.

O BAP, combinado ao 2,4-D, não intensificou a formação dos calos, pelos contrario, observou-se uma queda nas médias de formação de calos em explantes foliares, a media que se aumentavam as concentrações do BAP.

Em explantes radiculares observou-se formação de calos em todos os tratamentos, incluindo o controle.

Para os níveis de BAP testados não se obteve diferenças significativas na calogênese. Os calos aqui obtidos são amarelos cobrem todo o explantes.

O TDZ foi mais eficaz no menor nível e seus calos proliferam se nas extremidades do explantes.

O estudo fitoquímico indicou a presença de vários compostos, dentre eles, fenóis, taninos e triterpenóides.