

Márcia Regina Wolfart

**CALOS DE PASSIFLORAS SILVESTRES:  
INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA,  
METABÓLICA E ULTRAESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Santos

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Viana

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wolfart, Márcia Regina  
CALOS DE PASSIFLORAS SILVESTRES: INDUÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA, METABÓLICA E  
ULTRAESTRUTURAL / Márcia Regina Wolfart ; orientadora,  
Marisa Santos ; coorientadora, Ana Maria Viana. -  
Florianópolis, SC, 2015.  
119 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.  
Passifloraceae. 3. Calos. 4. Metabólitos secundários. 5.  
Histologia. I. Santos, Marisa. II. Viana, Ana Maria. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.


**“Calos de passifloras silvestres: indução,  
caracterização morfo-histológica, metabólica e  
ultraestrutural”**


por

**Márcia Regina Wolfart**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma  
final pelos membros titulares da Banca  
Examinadora (Port. 11/PPGFAP/2014) do  
Programa de Pós-Graduação em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta  
pelos Professores Doutores:

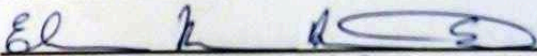
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Marisa Santos (Presidente/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior (AGC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Rosete Proenca (CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Neusa Steiner (CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas

Florianópolis, 11 de março de 2015.



*“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu: isto é ter sucesso.”*

*(Ralph Waldo Emerson)*



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Santos, pela confiança e dedicação, pelas inúmeras reuniões onde sentávamos pra discutir o trabalho, onde tirava minhas dúvidas, me ensinava a raciocinar e me deixava confiante para continuar. Obrigada pela sua amizade e pelo exemplo de profissional, por acreditar no potencial dos seus alunos.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana, por ter me orientado a trabalhar com os maracujazeiros silvestres, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas pela oportunidade e formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA CERRADOS) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC), pela disponibilidade de equipamentos e materiais e à técnica Eliane de Medeiros Oliveira por ensinar a operar o MEV, por me ajudar com todas as amostras e pela amizade.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcelo Maraschin por disponibilizar seu laboratório e o material para realizar as análises de metabólitos.

À equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Cláudia Marlene Bauer, Eva Regina de Oliveira Rodrigues e especialmente à Fernanda Ramlov, por terem me acompanhado em todos os procedimentos laboratoriais, pelas explicações, pelo auxílio na utilização de aparelhos, pela disponibilidade de tempo, pela confiança e por me fazerem sentir em “casa”.

À minha família pelo incentivo e por terem sido pacientes entendendo minha ausência em certas ocasiões. Ao meu namorado Jailton Campos Silva, por me entender e me respeitar e pelo seu amor, carinho e aconchego.

À equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), ao qual tive a honra de fazer parte por estes dois últimos anos. Às minhas grandes amigas e companheiras de trabalho Ana Paula Lando e Camilla Reis, pela amizade pura, pelas horas de conversa e conforto quando mais precisei; Thaysi Ventura de Souza e Geniane Sheneider pelos primeiros ensinamentos em bancada, Maiby Teodoro de Oliveira, Isabel Brandalise, Julia Faillace Thiesen, Raquel Kremer Cury, Hilaire Moura Rodrigues Martins, Roberta Royer, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Rodrigues, agradeço pela ajuda sempre que precisei e pelos momentos de descontração na hora do café e do chimarrão.

Aos meus compadres Elisa Poltronieri Filipin e Douglas Filipin que me incentivaram a conhecer a UFSC e a fazer a prova de mestrado, pessoas sempre dispostas a me apoiar, muito obrigada!

A todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

*Muito obrigada!!!*



## RESUMO

*Passiflora setacea* e *P. tenuifila* são espécies silvestres de maracujás endêmicas do Brasil, com importantes propriedades medicinais. A *P. setacea* apresenta também potencial para o mercado consumidor devido à qualidade de seus frutos e a *P. tenuifila* tem sido indicada para o melhoramento genético. A produção de metabólitos secundários via cultura de tecidos *in vitro* tem sido investigada como uma alternativa à utilização de plantas produzidas no campo, pois oferece ferramentas para promover a otimização da produção. Assim, os objetivos deste estudo foram: analisar a histologia de calos de *P. setacea* induzidos em 2,4-D; determinar efeitos de diferentes concentrações de ANA e fontes de Carbono, quanto à morfo-histologia, ultraestrutura e teores de metabólitos de calos de *P. tenuifila* e; caracterizar, com base na ultraestrutura, como a Matriz Extracelular (ME) determina a desintegração das células dos calos friáveis de espécies de *Passiflora*. Para o estudo sobre indução e histologia, amostras de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, obtidos a partir de diferentes tipos de explantes e meios de cultivo *in vitro*, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 e desidratadas. Para MO, amostras foram infiltradas em hidroxietilmetacrilato, seccionadas em micrótomo, coradas com azul de toluidina ou submetidas à reação com vermelho de rutênio, para identificar substâncias pécnicas. Para análise em MEV, amostras foram secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub> e, para análise em MET, amostras de calos de *P. tenuifila* foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, infiltradas em resina Spurr, seccionadas em ultramicrótomo, contrastadas com Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo. Calos de *P. tenuifila* com 45 dias foram coletados para determinar: percentagem de explantes que induziram calos, teor de água, acúmulo de biomassa, análise de metabólitos, atividade antioxidante por DPPH e a dosagem de clorofila. A percentagem mais elevada de explantes que formaram calos de *P. setacea* foi observada em 2,5 e 5,0 µM de 2,4-D. Calos obtidos a partir de segmentos de hipocótilo em 5,0 µM de 2,4-D e de segmento nodal foliar em 2,5 µM de 2,4-D mostraram características histológicas indicando grande potencial para morfogênese e produção de metabólitos secundários. Em estudo com calos de *P. tenuifila*, todas as fontes de carbono e concentrações de ANA permitiram altas

percentagens de produção de calos, sem diferenças entre os tratamentos. Todos os calos apresentaram textura friável e características histológicas similares. Compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides (luteína, zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno) foram detectados em calos de *P. tenuifila*. Atividade antioxidante não foi registrada. As características histológicas observadas sugerem que os calos de *P. tenuifila*, com 45 dias de cultivo, estavam em estágio inicial. No estudo sobre a ME verificamos sua constituição péctica. A superfície dos calos estava revestida com ME membranosa, com aspecto liso externamente e granular ou fibrilar internamente. O aspecto granular ou fibrilar decorre da desconexão entre células. A presença de golgi, vesículas na periferia da célula e evidências da liberação de substâncias e dissociação intercelular foram registradas ultraestruturalmente e sugerem que a consistência friável dos calos de *Passiflora* é resultante da desconexão das células periféricas.

**Palavras-chave:** indução de calos, 2,4-D, ANA, ultraestrutura, Passifloraceae, cultura *in vitro*, metabólitos secundários, morfo-histologia, Matriz extracelular

## ABSTRACT

*Passiflora setacea* and *P. tenuifila* are wild species of endemic passion fruit in Brazil, with important medicinal properties. *P. setacea* has also potential for the consumer market due to the quality of its fruit and *P. tenuifila* has been used for the genetic improvement. The production of secondary metabolites through *in vitro* tissue culture has been investigated as an alternative to the use of plants produced in the field, it provides tools for promoting the production optimization. The objectives of this study were to analyze the histology of *P. setacea* callus induced in 2,4-D; examine the effects of different concentrations of NAA and carbon sources in the morphological- histology, ultrastructure and level of metabolites in *P.tenuifila* callus and; to characterize, based on ultrastructure, how the Extracellular Matrix (EM) determines the disintegration of cells in friable callus of *Passiflora* species. For the study of induction and histology, samples of *P. tenuifila* and *P. setacea* callus, obtained from different types of explants and *in vitro* culture media were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium phosphate buffer 0, 1M, pH 7.2 and dried. For OM, the samples were infiltrated in methacrylate, sectioned with a microtome, stained with toluidine blue or subjected to reaction with ruthenium red to identify pectic substances. For SEM analysis, samples were dried in a critical point of CO<sub>2</sub>, and for TEM analysis, samples *P.tenuifila* callus were post-fixed in osmium tetroxide, infiltrated in Spurr resin, sectioned with ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate. *P.tenuifila* callus were collected with 45 days to determine: percentage of explants that to induced callus, water content, biomass accumulation, analysis of metabolites, antioxidant activity and measurement of chlorophyll. The highest percentage of explants that to induced *P. setacea* callus was observed at 2.5 and 5.0  $\mu$ M of 2,4-D. Callus from hypocotyl segment in 5.0  $\mu$ M 2,4-D and from leaf nodal segment in 2.5  $\mu$ M 2,4-D showed histological characteristics indicate great potential for morphogenesis and secondary metabolite production. In the study with *P. tenuifila* callus, all sources of carbon and NAA concentrations allowed high induction percentages, without differences between treatments. All callus showed friable texture and similar histological characteristics. Phenolic compounds, flavonoids and carotenoids (lutein, zeaxanthin and  $\alpha$ -carotene) were detected in *P. tenuifila* callus.

Antioxidant activity wasn't recorded. The histological characteristics suggest that *P.tenuifila* callus with 45 days were in initial stage. In the study about the EM we found your pectic constitution. The surface of the callus was coated with EM membranous, with smooth appearance externally and granular or fibrillar internally. The granular or fibrillar aspect stems from the disconnect between cells. The presence of Golgi, vesicles at the periphery of the cell and evidence of release of substances and intercellular dissociation were recorded by ultrastructure study and suggest that the *Passiflora* friable callus is the result of disconnection of peripheral cells.

**Keywords:** callus induction, 2,4-D, ANA, ultrastructure, Passifloraceae, *in vitro* culture, secondary metabolites, morpho-histology, Extracellular matrix

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. 1 Percentagem de explantes que induziram calos de *P. setacea* a partir de raiz, hipocótilo, segmento nodal cotiledonar (*Seg. N. Cot.*), segmento nodal foliar (*Seg N. Foliar*), folha e cotilédone, nas concentrações de 0  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, após oito semanas de cultivo *in vitro*. .....40
- Fig. 1. 2 Aspecto geral dos calos de *P. setacea* induzidos a partir de diferentes explantes e concentrações de 2.4-D.....41
- Fig. 1. 3 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares em concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.....43
- Fig. 1. 4 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais foliares com concentração de 2,5 mM de 2,4-D.....45
- Fig. 1. 5 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais foliares com concentração de 5,0 mM de 2,4-D.....46
- Fig. 1. 6 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de explantes de raiz em concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. ....47
- Fig. 1. 7 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* produzidos a partir explantes de hipocótilo na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.....48
- Fig. 1. 8 Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de explantes de cotilédone na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.....50
- Fig. 2. 1 Percentagens de explantes que formaram calos de *P. tenuifila* em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA).....78

Fig. 2. 2 Aspecto geral de calos friáveis de *P. tenuifila* induzidos a partir da cultura de segmentos caulinares em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA).. .... 80

Fig. 2. 3 Micrografias representativas de calos de *P. tenuifila* (MEV e MO), induzidos a partir de diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA).. ..... 81

Fig. 2. 4 Micrografias representativas de calos de *P. tenuifila* (MO e MET), induzidos a partir de diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA).. ..... 82

Fig. 3. 1 Eletromicrografias (MEV) de calos de *P. tenuifila* (a,b,e-f) e *P. setacea* (c,d)..... 107

Fig. 3. 2 Fotomicrografias de secções transversais de calos de *P. tenuifila* (a,c-e) e *P. setacea* (b)..... 108

Fig. 3. 3 Eletromicrografias (MET) de calos de *P. tenuifila*, produzidos a partir de segmento caulinar ..... 109

Fig. 3. 4 Eletromicrografias representativas em MET mostrando o grande acúmulo de substâncias entre as células de calos friáveis de *P. tenuifila*, produzidos a partir de segmento caulinar em diferentes fontes de carbono e concentrações de ANA..... 110

## LISTA DE TABELAS

Tab. 1. 1 Tabelas de contingência com os números observados e esperados (entre parênteses) de explantes que induziram e não induziram calos em baixas (0 e 1,25  $\mu\text{M}$ ) e elevadas (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) concentrações de 2,4-D. Os resultados dos testes de qui-quadrado são fornecidos para cada linha. ....40

Tab.2.1 Teor de água e razão de biomassa seca/ biomassa fresca em calos de *P. tenuifila* induzidos a partir de segmentos caulinares cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose, glucose ou frutose e diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). Dados após 45 dias de cultivo ..... 79

Tab.2. 2 Conteúdos de açúcares totais, amido, fenólicos totais e flavonóides em calos de *P. tenuifila* iniciados a partir de segmentos caulinares cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose, glucose ou frutose e diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). ....84

Tab.2.3 Concentração dos carotenóides (mg/g MS) determinados por CLAE para extratos organossolventes (hexano:acetona:BHT) de calos de *P. tenuifila* produzidos a partir de segmentos caulinares jovens em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) .....85





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>201</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>
<b>1. CAPÍTULO I .....</b>	<b>33</b>
<b>FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE CALOS DE PASSIFLORA SETACEA (PASSIFLORACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES E CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D .....</b>	<b>33</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>33</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>34</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1.2.1 MATERIAL VEGETAL .....	37
1.2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO DE PLANTAS AXÊNICAS.....	37
1.2.3 INDUÇÃO DE CALOS .....	37
1.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
1.2.5 TEXTURA E ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CALOS .....	38
<b>1.3 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
1.3.1 EFEITO DE 2,4-D E TIPOS DE EXPLANTES NA INDUÇÃO DE CALOS DE PASSIFLORA SETACEA	39
1.3.2 TEXTURA E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA .....	41
<b>1.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>1.5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>2. CAPÍTULO II .....</b>	<b>61</b>
<b>INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA, METABÓLICA E ULTRAESTRUTURAL DE CALOS DE PASSIFLORA TENUIFILA KILLIP (PASSIFLORACEAE) .....</b>	<b>61</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>61</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>63</b>

<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	65
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
2.2.1 MATERIAL VEGETAL .....	67
2.2.1.1 Produção de plantas jovens in vitro a partir de ápices caulinares.....	67
2.2.1.2 Indução de calos a partir de segmentos caulinares.....	68
2.2.2 TEOR DE ÁGUA E ACÚMULO DE BIOMASSA DOS CALOS OBTIDOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	69
2.2.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS.....	69
2.2.3.1 Extração e dosagem de açúcares solúveis totais .....	70
2.2.3.2 Extração e dosagem de amido .....	70
2.2.3.3 Compostos fenólicos totais e flavonóides .....	71
2.2.3.4 Carotenóides .....	72
2.2.3.5 Atividade Antioxidante por DPPH .....	73
2.2.3.6 Clorofila .....	73
2.2.4 TEXTURA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA .....	74
2.2.4.1 Microscopia óptica (M0) .....	74
2.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	75
2.2.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	75
2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	76
<b>2.3 RESULTADOS</b> .....	76
<b>2.4 DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>2.5 REFERÊNCIAS</b> .....	91
<b>3. CAPÍTULO III</b> .....	<b>97</b>
<b>ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR NA FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS EM PASSIFLORA L.</b> .....	<b>97</b>
<b>RESUMO</b> .....	97
<b>ABSTRACT</b> .....	99

<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	100
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	101
3.2.1 MATERIAL VEGETAL .....	101
3.2.1 PRODUÇÃO DE CALOS DE P. TENUIFILA... 102	
<b>3.2.1.1 Obtenção de explantes</b> .....	102
<b>3.2.1.2 Indução de calos de P. tenuifila a partir de segmentos caulinares</b> .....	102
3.2.2 PRODUÇÃO DE CALOS DE P. SETACEA .... 103	
<b>3.2.2.1 Germinação de sementes e estabelecimento de plantas axênicas</b> .....	103
<b>3.2.2.2 Indução de calos de P. setacea a partir de explantes de raiz, hipocótilo e cotilédone</b> .....	103
3.2.3 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	104
3.2.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ESTUDOS HISTOLÓGICOS .....	104
<b>3.2.4.1 Microscopia Óptica (MO)</b> .....	104
<b>3.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	104
<b>3.2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b> .....	105
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	105
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	110
<b>3.5 REFERÊNCIAS</b> .....	113
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	119



## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* L. pertence a família Passifloraceae e compreende quatro subgêneros e 520 espécies distribuídas nas regiões tropical e subtropical (Ulmer & MacDougal, 2004). No Brasil, ocorrem 142 espécies, das quais 83 são endêmicas (Bernacci *et al.*, 2015). Devido à contínua expansão técnica, a cultura do maracujazeiro está difundida em quase todo o território nacional (Ruggiero *et al.*, 1996; Souza & Meletti, 1997). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial, compreendendo 97% das áreas de plantio (Ferraz & Lot, 2006) e produzindo anualmente cerca de 920 toneladas de maracujá-amarelo (Embrapa, 2010). Esta atividade vem sendo considerada uma excelente alternativa de renda para a agricultura familiar, empregando aproximadamente 250.000 pessoas (Lima, 2001).

Muitas espécies de maracujazeiros são utilizadas popularmente por suas propriedades sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas e antitumorais, além de serem recomendadas no tratamento de dependência química, obesidade, para controlar tremores e distúrbios nervosos diversos (Dhawan *et al.*, 2004; Costa & Tupinambá, 2005; Zeraik *et al.*, 2010). As propriedades medicinais são conferidas pela riqueza de substâncias bioativas, presentes em espécies de *Passiflora*, as quais são exploradas e utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos consumidos em vários países (Drawan *et al.*, 2004; Fiebich *et al.*, 2011; Ozarowski & Thiem, 2013), principalmente no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2005; Marlière *et al.*, 2008). Por isso, muitas passifloras têm importância econômica mundial (Rocha *et al.*, 2012).

Os principais fito-constituintes encontrados em *Passiflora* são os alcalóides, os flavonóides e os carotenóides entre outros (Zeraik *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011). Muitos dos alcalóides têm valor medicinal, como tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (Harborne &

Baxter, 1995). Os flavonóides apresentam efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica e vasodilatadora. Além disso, reduzem o risco de doenças cardiovasculares, efeito este relacionado à sua atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais livres em organismos vivos (Hollman *et al.*, 1996; Cook & Samman, 1996; Hollman & Katan, 1997). A maioria dos trabalhos sobre os flavonóides do maracujá foi realizada em folhas e partes aéreas (Zeraik *et al.*, 2010). A atividade antioxidante também têm efeitos protetores contra doenças relacionadas ao transtorno de estresse oxidativo, como o envelhecimento, doenças degenerativas e o câncer (Cozzi *et al.*, 1997). Outros constituintes dos maracujazeiros, os carotenóides, possuem importante papel na dieta humana por serem precursores de vitamina A. Esta atividade vitamínica é atribuída à estrutura retinóide (com anel  $\beta$ -ionona). O  $\beta$ -caroteno é o que possui maior atividade como precursor da vitamina A. Os carotenóides, assim como os flavonóides, também atuam como antioxidantes na prevenção do câncer, catarata, arteriosclerose e processos de envelhecimento em geral (Von Elbe & Schwartz, 1996; Barbosa-Filho *et al.*, 2008).

Apesar da grande importância das substâncias bioativas encontradas em *Passiflora*, os principais estudos disponíveis se referem aos fito-constituintes de *P. edulis* e *P. incarnata*, sendo raras as informações para as demais espécies do gênero (Patel *et al.*, 2011). Geralmente, os compostos bioativos são obtidos da coleta predatória e indiscriminada (Villareal *et al.*, 1997), a qual, associada à degradação do ambiente para a expansão agrícola ou industrial (Ferreira, 2005), pode causar a eliminação de espécies selvagens e de genótipos que poderiam ser utilizados no melhoramento genético (Faleiro *et al.*, 2011). Outra forma de obtenção de substâncias de interesse farmacológico é a produção via cultivo de plantas. No entanto, Murthy *et al.* (2014) apontaram várias

desvantagens deste método, como o baixo rendimento e flutuações na concentração devido a variações geográficas, ambientais e sazonais.

Por isso, a cultura de tecidos *in vitro* tem sido sugerida como uma boa alternativa para a produção de metabólitos secundários, tanto do ponto de vista ecológico, quanto do ponto de vista econômico (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Fumagali *et al.*, 2008). Esta técnica vem sendo utilizada e melhorada por muitos pesquisadores possuindo potencial para a produção em larga escala sob condições rigorosamente controladas (Antognoni *et al.*, 2007), o que tem atraído a atenção de cientistas. Contudo, para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de determinada espécie informações como o tipo ideal de explante, a composição do meio de cultura, as condições ambientais e o equilíbrio hormonal adequado são preliminarmente requeridos (Peres 2002; Alves *et al* 2004; Ge *et al* 2006; Santos 2010).

Murphy *et al.*(2014) consideraram dois estágios na produção de metabólitos secundários a partir do cultivo *in vitro*: o primeiro consiste no cultivo de células e órgãos para o crescimento, multiplicação e acúmulo de biomassa (calos) e o segundo, se refere a síntese de metabólitos a partir dos calos. Murphy *et al.*(2014) salientam que no primeiro estágio para a produção de metabólitos secundários *in vitro* é possível selecionar células ou órgãos de alta produção e otimizar parâmetros para o acúmulo de biomassa. Calos são massas celulares em grande parte não-organizadas e indiferenciadas, que surgem a partir do crescimento descoordenado e desorganizado de pequenos órgãos vegetais, pedaços de tecido vegetal, ou células previamente cultivadas, em condições estéreis (George, 2008). O calo formado sobre um explante original é chamado de calo primário. Calos secundários são iniciados a partir de pedaços de tecido destacados do calo primário. A subcultura pode ser continuada ao longo de muitos anos (George, 2008).

A divisão ativa de células não especializadas que compõem o calo é estimulada por reguladores de crescimento endógenos ou por substâncias químicas adicionadas ao meio de cultura (George, 2008). Entre os hormônios vegetais mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento na cultura de tecidos e órgãos *in vitro* encontramos as auxinas (Vasil & Thorpe, 1994). As auxinas têm importante papel nos processos de alongamento celular, início da divisão celular, definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (Gaspar *et al.*, 1996). Comumente, na área de cultivo *in vitro*, pesquisadores utilizam auxinas sintéticas, sendo as mais conhecidas o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizado para a indução de calos e culturas em suspensão, e o ácido 1-naftalenoacético (ANA), geralmente utilizado para a organogênese (Gaspar *et al.*, 1996).

No segundo estágio para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, podem ser utilizadas técnicas complementares para aumentar as taxas de produção (Palacio *et al.*, 2012). O estabelecimento de culturas *in vitro*, além de ser o primeiro passo para estes estudos, é importante para aumentar o número de espécies e acessos conservados e caracterizados, visando um melhor aproveitamento da variabilidade genética do gênero (Faleiro *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm sido realizados em cultura de tecidos de espécies de *Passiflora*, entre eles, podem ser citados: Isutsa (2004), Busilacchi *et al.* (2008), Silva *et al.* (2009), Pipino *et al.* (2010), Silva *et al.* (2011), Pinto *et al.* (2011) e Pacheco *et al.* (2012). No entanto, poucos dados sobre a produção de compostos bioativos através da cultura de tecidos *in vitro* estão disponíveis para este gênero (Lugato *et al.*, 2014), principalmente para espécies silvestres endêmicas do Brasil, como a *P. setacea* D.C e a *P. tenuifila* Killip. Até o momento não foram encontradas pesquisas sobre o estabelecimento de calos *in vitro* destes dois maracujazeiros, tão pouco sobre as características



histológicas e conteúdos de metabólitos secundários de culturas primárias. Por terem grande potencial no uso como plantas medicinais, para o mercado consumidor e no melhoramento genético, torna-se essencial obter informações sobre o cultivo de calos *in vitro* destas espécies.

Assim, este estudo teve por finalidade determinar efeitos de diferentes tipos de explantes na indução de calos de duas espécies de passifloras silvestres, *P. setacea* e *P. tenuifila*, submetidos a distintas condições de meios de cultivo (variações nas concentrações de fitohormônios e fontes de carbono), caracterizando os calos quanto à morfo-histologia, teores de metabólitos secundários e aspectos ultraestruturais.

Sendo assim, o trabalho foi organizado em três capítulos. O primeiro abordando indução e caracterização histológica de calos de *P. setacea*, a partir de diferentes tipos de explantes e concentrações de 2,4-D. O segundo, abrangendo aspectos relativos à indução, caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural de *P. tenuifila*. O terceiro destacando aspectos ultraestruturais da matriz extracelular relacionados com a formação de calos friáveis em espécies de *Passiflora*, mas especificamente em *P. setacea* e *P. tenuifila*.

## REFERÊNCIAS

- Alves ECS, Xavier A, Otoni WC (2004). Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore** **28**: 643-653
- Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangulares* callus cultures. **Fitoterapia** **78**: 345-352
- Barbosa-Filho JM, Alencar AA, Nunes XP, Tomaz ACA, Sena-Filho JG, Athayde-Filho PF, Silva MS, Souza MFV, Leitão da Cunha EV (2008). Sources of alpha, beta, gamma, delta and epsilon carotenes: a twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18**: 135-154
- Bernacci, L. C.; Cervi, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; Nunes, T.S.; Imig, D.C.; Mezzonato, A.C. *Passifloraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 02 Jan. 2015
- Busilacchi H, Severin C, Gttuso M, Aguirre A, Di Sapiro O, Gattuso S (2008). Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas** **7**: 257-263
- Caldas L S, Haridasan P, Ferreira ME (1998) Meios Nutritivos. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S; Buso, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, p.87-132.
- Cook NC, Samman S (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry** **7**: 66-76

Costa AM, Tupinambá DD (2005). O maracujá e suas propriedades medicinais: estado da arte. *In*: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF(Eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p 475-506

Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, Gatta V, Petricone P, De Salvia R (1997). Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis** **18**: 223-228

Cunha MAP, BARBOSA LV, FARIA G A (2004). Botânica. *In*: LIMA A A, CUNHA MAP. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 15-35

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 1-23

EMPRAPA (2010). Produção Brasileira de Maracujá em 2010. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja\\_Brasil\\_2010.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2010.pdf). Acesso em: 06 de jun. 2013

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga M F, Oliveira EJ, Peixoto JR, Costa AM (2011). **Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro: Histórico e Perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados

Ferraz JV, Lot L (2006). Fruta para consumo *in natura* tem boa perspectiva de renda. *In*: Harada, E.; Ferraz, J. V.; Da-Silva, M. L. M. 2006. **Agriannual 2006**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, p.387-388.

Fiebich BL, Knörle R, Appel K, Kammler T, Weiss G (2011). Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): *in vitro* and *in vivo* evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in

antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia** **82**: 474-480

Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, Vidoti GJ, Oliveira AJB (2008). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18**: 627-641

Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular and Development Biology Plant** **32**: 272-289

Ge X, Chu Z, Lin Y, Wang S (2006). A tissue culture system for different germplasms of indica rice. **Plant Cell Reports** **25**: 392-402

George EF, Debergh PC (2008). Plant Tissue Culture Procedure: Background. *In*: George EF, Hall MA, Klerk GJ (Ed). **Plant propagation by tissue culture**, 3ed, Dordrecht: Springer, p.1-28

Harborne JB, Baxter H (1995). Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. London: Taylor e Francis

Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB (1996). Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry** **57**: 43-46

Hollman PCH, Katan MB (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother** **51**: 305-310

Isutsa DK (2004). Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae** **99**: 395-400

Lima MM (2001). Competitividade da cadeia produtiva do maracujá na região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno-Ride. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia), Brasília: Universidade de Brasília, 171 p.

Lugato D, Simão MJ, Garcia R, Mansur E, Pacheco G (2014). Determination of antioxidant activity and phenolic contents of extracts from *in vitro* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **118**: 339-346

Manica, I. 1981. **Maracujá: Fruticultura tropical**. São Paulo: Ceres, 160p.

Marlière LDP, Ribeiro AQ, Brandão MGL, Klein CH, Acurcio FA (2008). Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia** **18**: 754-760

Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **118**: 1-16

Ozarowski M, Thiem B (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **23**: 937-947

Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012). Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae** **144**: 42-47

Palacio L, Cantero JJ, Cusidó R, Goleniowski M (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science** **193-194**: 1-7

Patel SS, Mishra HSK, Singhai AK (2011). Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **Research in Phytochemistry and Pharmacology** **1**: 1-16

Peres LEP (2002). Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento 25**: 44-48

Pinto PDL, Almeida AMR, Rego MM, Silva ML, Oliveira EJ, Oton WC (2011). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture 107**: 521-530

Pipino L, Braglia L, Giovannini A, Fascella G, Mercuri A (2008). *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants 8**: 47-49

Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances 20**: 101-153

Ribeiro AQ, Leite JPV, Dabtas-Barros AM (2005). Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira Farmacognosia 15**: 65-70

Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012). Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture 111**: 69-78

Ruggiero C, São José AR, Volpe CA, Oliveira JF, Baumgartner JG, Silva JR, Makamura KI, Ferreira VP (1996). **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa, 64 p

Santos FC, Ramos JD, Pasqual M, Rezende JC, Santos FC, Villa F (2010). Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres 57**: 112-117

Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LC, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011). Organogenesis

from root explantes of commercial population of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tiss Organ Cult** **107**: 407-416

Silva ML, Pinto DLP, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009). A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tiss Organ Cult** **99**: 47-54

Sousa JSI, Meletti LMM (1997). **Maracujá: espécies, variedades e cultivos**. Piracicaba: FEALQ, 179p

Ulmer T, MacDougal JM (2004). **Passiflora: Passiflowers of the world**. Timber Press, Portland, 430 p

Vasil LK, Thorpe TA (1994) **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

Villareal ML, Arias C, Vega J, Feria-Velasco A, Raminez OT, Nicasio P, Rojas G, Quintero R (1997). Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum*: a plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tiss Org Cult** **50**: 39-44

Von Elbe JH, Schwartz SJ (1996). Colorants. *In*: Fennema O (ed.) Food Chemistry, New York: Marcel Dekker Inc. p. 674-681

Zeraik ML, Pereira CAM, Zuin VG, Yariwake JH (2010). Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia** **20**: 459-471





## 1. CAPÍTULO I

### FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE CALOS DE *Passiflora setacea* (PASSIFLORACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES E CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D

#### RESUMO

*Passiflora setacea* tem importante potencial para o mercado consumidor devido à qualidade de seus frutos e propriedades medicinais. A produção de metabólitos secundários via cultura de tecidos *in vitro* de espécies de *Passiflora* tem sido investigada como uma alternativa à utilização de plantas produzidas no campo, pois oferece as ferramentas para promover a otimização da produção por fatores bióticos e abióticos e transformação genética. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a histologia de calos de *P. setacea* induzidos em ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a partir de diferentes tipos de explantes de plântulas. Segmentos de raiz, hipocótilo, segmentos nodais cotiledonares, segmentos nodais foliares, folha e cotilédones foram excisados de plantas axênicas germinadas *in vitro* e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 59 mM de sacarose, 0,2% Phytigel e concentrações de 0; 1,25; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  2,4-D. Após oito semanas de cultura a percentagem de formação de calos foi avaliada e a análise histológica foi realizada por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. A percentagem mais elevada de indução de calos foi observada em 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D em todos os tipos de explantes. Calos de segmentos de hipocótilo em 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e de segmento nodal foliar em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram características histológicas, tais como a presença de estruturas globulares, indicando grande potencial para morfogênese e produção de metabólitos secundários.

**Palavras-chave:** indução de calos, 2,4-D, ultraestrutura, Passifloraceae, cultura *in vitro*.

## ABSTRACT

*Passiflora setacea* has important potential to consumer market for the quality and medicinal properties of its fruit. The secondary metabolite production by *in vitro* culture of *Passiflora* species has been investigated as an alternative to plant production in the field as it offers the tools to foster the optimization by biotic and abiotic factors and genetic transformation. Thus, the aim of this study was to analyzed the histology of *P. setacea* calli induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) from different seedling explant types. Root, hypocotyl, cotyledonary nodal segments, leaf nodal segments, leaf and cotyledon were excised from *in vitro* germinated axenic plants and inoculated in MS culture medium supplemented with 59 mM sucrose, 0,2% Phytigel and concentrations of 0, 1.25, 2.5 and 5  $\mu$ M 2,4-D. After eight weeks culture the percentage of callus induction was evaluated and the histological analysis was performed by light microscopy and scanning electron microscopy. The highest percentage of callus induction was observed at 2.5 and 5.0  $\mu$ M 2,4-D in all explant types. Calluses from hypocotyl segment in 5.0  $\mu$ M 2,4-D and from leaf nodal segment in 2.5  $\mu$ M 2,4-D histological characteristics such as the presence of globular structures that indicate their great potential for morphogenesis and secondary metabolite production.

**Key words:** callus induction, 2,4-D, ultrastructure, Passifloraceae, *in vitro* culture.

## 1.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é de especial interesse no Brasil, que é considerado um dos centros de diversidade deste gênero com 142 espécies nativas (Bernacci *et al.*, 2015). Muitas destas espécies têm importância econômica mundial (Rocha *et al.*, 2012). São ricas em substâncias bioativas e utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos consumidos em vários países (Drawan *et al.*, 2004; Fiebich *et al.*, 2011; Ozarowski & Thiem, 2013), principalmente no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2005; Marlière *et al.*, 2008).

*Passiflora setacea* D.C é uma das espécies de maracujazeiros silvestres endêmicas do Brasil (Bernacci *et al.*, que têm atraído atenção de pesquisadores. De acordo com Oliveira e Ruggiero (2005), é tolerante a alguns patógenos, sendo resistente à fusariose e à antracnose. Por isso, constitui uma excelente fonte de resistência genética (Ataíde *et al.*, 2012) e pode ser útil como porta-enxerto e para o melhoramento genético de outras espécies de maracujá (Meletti *et al.*, 2002, Junqueira *et al.*, 2005, Braga *et al.*, 2006). Outra característica é o seu potencial para a incorporação no mercado consumidor. Seus frutos possuem sabor exótico e adocicado, excelentes qualidades para o consumo *in natura* e para a produção de doces e sorvetes. Tal como os demais maracujazeiros, possui importantes propriedades de interesse medicinal (Ataíde, 2012).

Geralmente plantas que produzem compostos bioativos, como os maracujazeiros nativos, são obtidas a partir da coleta predatória e indiscriminada (Villareal *et al.*, 1997). Associada à degradação do ambiente para a expansão agrícola ou industrial (Ferreira, 2005), causa a eliminação de espécies selvagens e de genótipos que poderiam ser utilizados no melhoramento genético (Faleiro *et al.*, 2011). Além disso, a produção destes compostos via cultivo de plantas têm várias desvantagens como o baixo

rendimento e flutuações na concentração devido a variações geográficas, ambientais e sazonais (Murthy *et al.*, 2014).

Assim, a cultura de tecidos *in vitro* tem sido sugerida como uma boa alternativa para a produção de metabólitos secundários, tanto do ponto de vista ecológico quanto do ponto de vista econômico (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Fumagali *et al.*, 2008). Esta técnica vem sendo utilizada e melhorada por muitos pesquisadores e Murphy *et al.* (2014) considera dois estágios na produção: (1) cultivo de células e órgãos para o crescimento, multiplicação e acúmulo de biomassa, (2) síntese de metabólitos a partir da biomassa. Murphy *et al.* (2014) salienta que no primeiro estágio é possível selecionar células ou órgãos de alta produção e otimizar parâmetros para o acúmulo de biomassa. No entanto, o estabelecimento do tipo ideal de explante, a composição do meio de cultura, as condições ambientais e o equilíbrio hormonal adequado são preliminarmente requeridos (Peres 2002; Alves *et al.* 2004; Ge *et al.* 2006; Santos 2010). No segundo estágio podem ser utilizadas técnicas complementares para aumentar as taxas de produção de compostos fenólicos, por exemplo (Palacio *et al.*, 2012).

Muitos estudos têm sido realizados em cultura de tecidos de espécies de *Passiflora* por Isutsa (2004), Busilacchi *et al.* (2008), Silva *et al.* (2009), Pipino *et al.* (2010), Silva *et al.* (2011), Pinto *et al.* (2011) e Pacheco *et al.* (2012). No entanto, *P. setacea* têm sido somente investigada para micropropagação a partir de sementes por Santos *et al.* (2010). Há também falta de conhecimento sobre a indução de calos e histologia, que são relevantes para elucidar a estrutura celular e indicar o potencial de acúmulo de biomassa e síntese de metabólitos secundários. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a histologia de calos de *P. setacea* induzidos a partir de diferentes tipos de explantes com ácido 2,4-diclorofenoxiacético diferente (2,4-D).

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes de *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) foram recebidas do banco de germoplasma de Passifloras da Embrapa Cerrados. Para a produção de calos foram utilizados explantes provenientes de plântulas axênicas germinadas *in vitro*.

### 1.2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO DE PLANTAS AXÊNICAS

As sementes foram lavadas com água e detergente neutro, enxaguadas (4x), desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (v/v) por 10 min e lavadas (4x) com água destilada esterilizada. Posteriormente foram inoculadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 ( $\pm 0,1$ ) utilizando HCl (1N) e NaOH (1N). O meio de cultura foi esterilizado por 18 min a 121°C e 1,1 Kgf/cm<sup>3</sup>. As sementes inoculadas em tubos selados com filme de polipropileno foram mantidas em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de 25 ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 22,3  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e umidade relativa de 70%. Estas condições de cultura foram utilizadas em todos os experimentos.

### 1.2.3 INDUÇÃO DE CALOS

Explantos de raiz, de hipocótilo, de segmento nodal cotiledonar, de segmento nodal foliar, de folha e de cotilédone foram excisados de plantas axênicas de *Passiflora setacea* com oito semanas de cultivo. Os explantes foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) suplementado com 59 mM de sacarose,

0,2% (m/V) de Phytigel e concentrações de 0; 1,25; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Após oito semanas foi avaliada a percentagem de explantes que induziram calos.

#### 1.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito do 2,4-D na indução de calos foi avaliado independentemente. Foi aplicado o teste Qui-quadrado para tabelas de contingência com números observados e esperados (Sokal & Rohlf, 1995).

#### 1.2.5 TEXTURA E ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CALOS

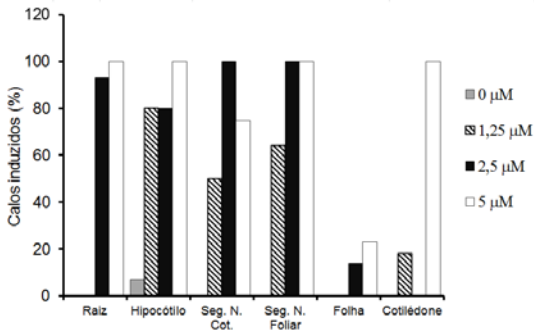
A observação da textura e a microscopia foram realizadas para amostras de calos provenientes de explantes que apresentaram o maior percentual de indução (100%). Foram considerados friáveis os calos que apresentaram aglomerados celulares que facilmente se destacavam ao toque da pinça e, compactos, os calos com estrutura rígida, difícil de destacar ou seccionar. Amostras dos calos foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica (Gerrits & Smid, 1983). Para microscopia óptica as amostras foram infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica Histoiresin, Heidelberg, Alemanha). Secções com 3  $\mu\text{m}$  foram obtidas em micrótomo rotativo RM 2125 RT (Leica, Nussloch, Alemanha) e distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (42° C). Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964) para caracterização histológica. Para identificar substâncias pécticas foi utilizado o vermelho de rutênio (Gerlach, 1984). Lâminas permanentes foram confeccionadas com verniz vitral incolor 500® (Paiva *et al.* 2006) e as imagens foram capturadas com microscópio óptico DM 2500 (Leica,

Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça). Outras amostras para microscopia eletrônica de varredura foram submetidas a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> EM CDP 030 (Leica, Heidelberg, Germany), conforme metodologia de Horridge & Tamm (1969). Foram aderidas em suportes de alumínio com fita dupla de carbono e recobertas com ouro paládio em metalizador EM 500 SCD (Leica, Viena, Áustria). As amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol XL30 (Tokio, Japão).

### **1.3 RESULTADOS**

#### **1.3.1 EFEITO DE 2,4-D E TIPOS DE EXPLANTES NA INDUÇÃO DE CALOS DE *PASSIFLORA SETACEA***

A percentagem de explantes que induziram calos variou de acordo com a concentração de 2,4-D no meio de cultura (Fig.1.1 e Tab. 1.1). Concentrações mais elevadas (2,5  $\mu$ M e 5,0  $\mu$ M) permitiram maiores percentagens de indução de calos em todos os tipos de explantes. Na ausência desta auxina a indução de calos ocorreu apenas em segmentos de hipocótilo, mas em baixo percentual. Todos os tipos de explantes apresentaram 100% de indução de calos em 2,5 e 5,0  $\mu$ M de 2,4-D, exceto segmentos de folhas. O aspecto geral de calos a partir de diferentes tipos de explantes é mostrado na Figura 1.2.

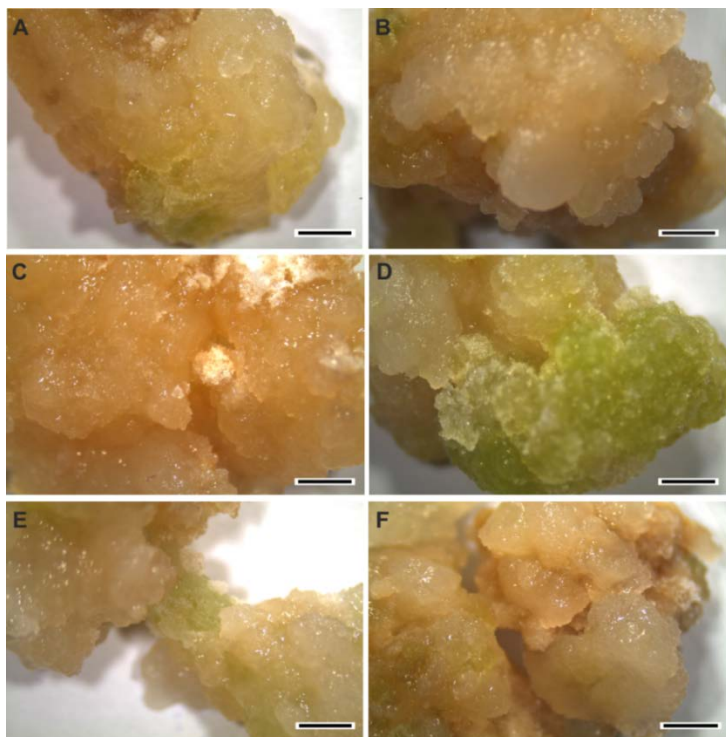


**Fig. 1. 1** Percentagem de explantes que induziram calos de *P. setacea* a partir de raiz, hipocótilo, segmento nodal cotiledonar (*Seg. N. Cot.*), segmento nodal foliar (*Seg N. Foliar*), folha e cotilédone, nas concentrações de 0  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, após oito semanas de cultivo *in vitro*.

**Tab. 1. 1** Tabelas de contingência com os números observados e esperados (entre parênteses) de explantes que induziram e não induziram calos em baixas (0 e 1,25  $\mu\text{M}$ ) e elevadas (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) concentrações de 2,4-D. Os resultados dos testes de qui-quadrado são fornecidos para cada linha.

Tipo de Explante	Baixas conc. de 2,4-D		Altas conc. de 2,4-D		Qui-quadrado	
	0 e 1,25 $\mu\text{M}$		2,5 e 5,0 $\mu\text{M}$		$\chi^2$	p
	Explantes que induziram calos	Explantes que não induziram calos	Explantes que induziram calos	Explantes que não induziram calos		
Raiz	0 (11)	23 (12)	23 (12)	1 (12)	41	> 0,05
Hipocótilo	13 (19)	16 (10)	21 (14)	2 (8)	12,6	> 0,05
Seg. N. Cotiledonar	5 (11)	15 (9)	16 (10)	2 (8)	15,4	> 0,05
Folha	0 (2,6)	30 (27)	5 (2,4)	22 (25)	66,06	> 0,05
Seg. N. Foliar	7 (14)	15 (8)	20 (13)	0 (7)	20,3	> 0,05
Cotilédone	2 (7)	19 (14)	12 (7)	10 (15)	10,7	> 0,05





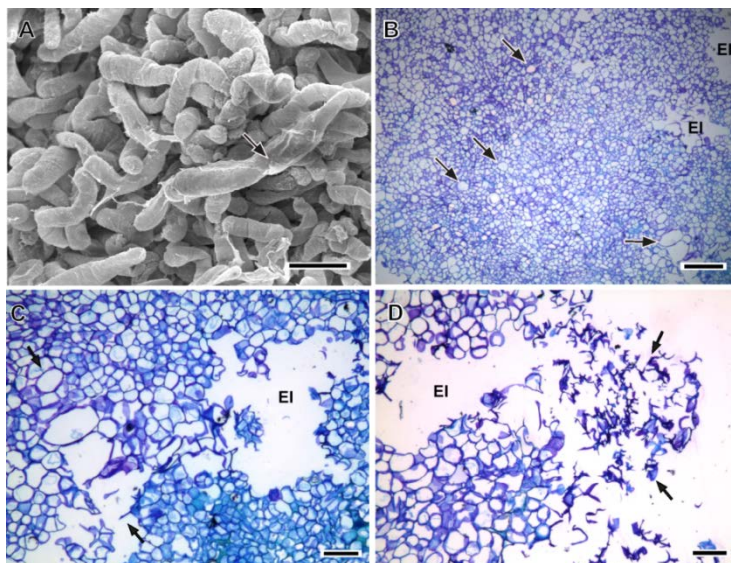
**Fig. 1. 2** Aspecto geral dos calos de *P. setacea* induzidos a partir de diferentes explantes e concentrações de 2,4-D. Em concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D: a calo de segmento nodal cotiledonar. b calo de segmento nodal foliar. Em concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D: c calo de segmento nodal foliar. d calo de raiz. e calo de hipocótilo. f calo de cotilédone, barra de escala=2mm.

### 1.3.2 TEXTURA E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA

A textura dos calos variou de friável à compacta dependendo do tipo de explante utilizado. A textura compacta foi observada em calos induzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, mas nos calos de segmentos nodais foliares nesta mesma concentração, a textura mostrou-se friável. A textura friável

também foi observada em calos provenientes de explantes de raiz e de hipocótilo, quando utilizada a concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Nesta concentração, calos de segmento nodal foliar e de cotilédone apresentaram textura friável, porém com algumas regiões mais compactas.

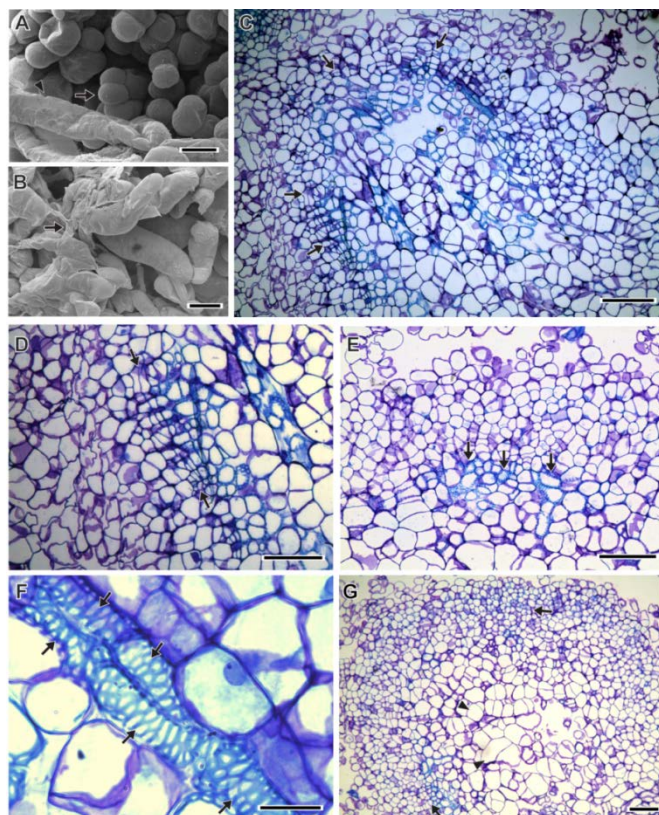
Calos induzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares em concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram somente células alongadas e frouxamente aderidas na sua superfície (Fig. 1.3a), algumas parcialmente envolvidas por matriz extracelular (ME). A ME apresentou substâncias pécticas em sua composição, as quais reagiram positivamente ao vermelho de rutênio. Regiões internas do calo mostraram tecido homogêneo e compacto com células de paredes delgadas, apesar de haver locais com grandes espaços intercelulares e algumas células com lúmen amplo (Fig. 1.3b). Estas células grandes formam uma linha de ruptura que resulta na formação de espaços intercelulares ou lacunas (Fig. 1.3c). Em secções periféricas do calo foram observadas amplas lacunas e remanescentes de parede, resultantes da degradação celular (Fig. 1.3d).



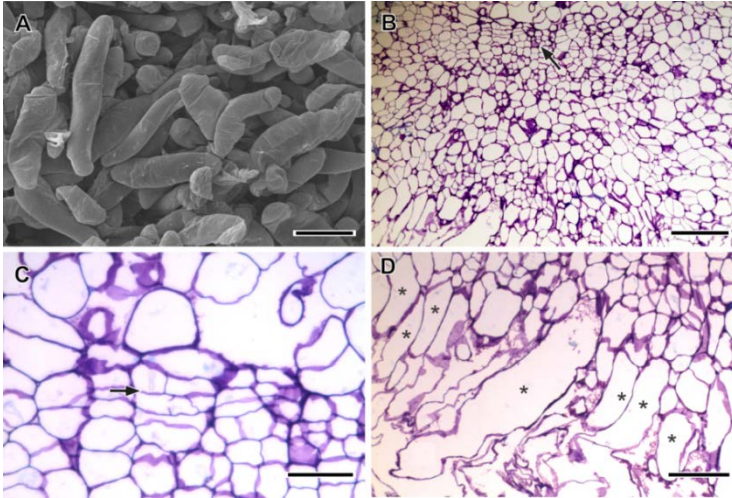
**Fig. 1. 3** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares em concentração de  $2,5 \mu\text{M}$  de 2,4-D. a superfície do calo constituída por células alongadas parcialmente cobertas por matriz extracelular (seta). b regiões internas do calo mostrando tecido homogêneo e compacto, apesar de possuir regiões com espaços intercelulares (EI) e algumas células com lúmen amplo (setas). c células grandes formam uma linha de ruptura (setas) que resulta na formação de espaços intercelulares (EI). d secção da região periférica do calo mostrando espaço intercelular (EI) e remanescentes de parede (setas), resultantes da degradação celular, barra de escala=100 $\mu\text{m}$ .

Calos derivados de segmentos nodais foliares em  $2,5 \mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram uma formação contínua de novas estruturas globulares. Na superfície do calo dois tipos de células foram observadas, células curtas, em maior número, e células longas (Fig. 1.4a). A ME foi observada em células que apresentaram reação positiva

para substâncias pécticas, identificados pelo vermelho de ruténio. Em secção transversal da região interna dos calos observaram-se a presença de tecido cambial em forma de arco (Fig. 1.4c). Células no entorno do tecido cambial são achatadas (Fig. 1.4d) e apresentam intensa atividade mitótica. Entre as células cambiais foram observados elementos traqueais diferenciados, mostrando diferenciação celular. A porção central do calo é delimitada por células do tecido cambial e formada por células com lúmen amplo e espaços intercelulares conspícuos (Fig. 1.4G). No entanto, quando o calo a partir deste mesmo tipo de explante foi induzido com 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, uma superfície formada por células alongadas foi detectada (Fig. 1.5a). O tecido cambial também estava presente na posição central no calo (Fig. 1.5b). Este tecido foi formado por células achatadas (Fig. 1.5C) e mostrou intensa atividade mitótica. As células adjacentes tinham lúmen amplo (Fig. 1.5c) e as células distantes do tecido cambial estavam mais expandidas (Fig. 1.5d), culminando com as células alongadas observadas na superfície do calo.



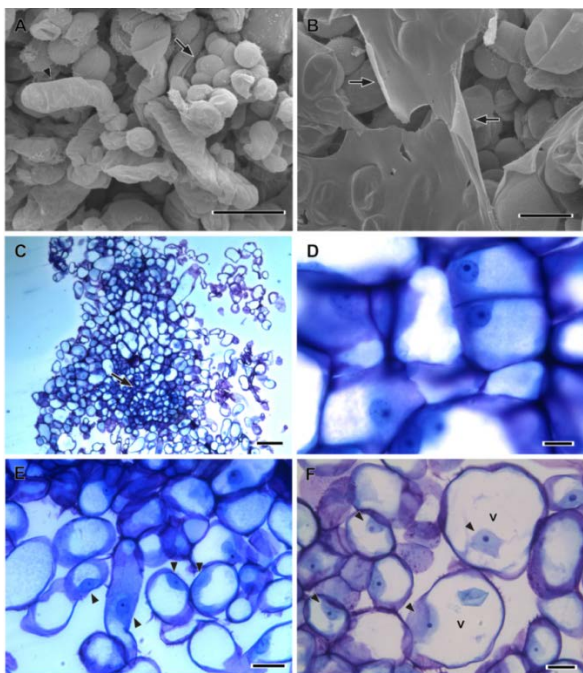
**Fig. 1. 4** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais foliares com concentração de 2,5 mM de 2,4-D. a superfície do calo constituída por células curtas (*seta*) e células longas (*ponta de seta*). b células longas parcialmente envolvidas por matriz extracelular (*seta*). c secção transversal da região interna do calo mostrando tecido cambial em forma de arco (*setas*). d tecido cambial formado por células achatadas em intensa atividade mitótica (*setas*). e-f elementos traqueais diferenciados entre as células achatadas do tecido cambial (*setas*). g região central do calo formada por células com lúmen amplo e espaços intercelulares conspícuos (*ponta de seta*), delimitada pelo tecido cambial (*setas*), *barra de escala*=100  $\mu$ m.



**Fig. 1. 5** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de segmentos nodais foliares com concentração de 5,0 mM de 2,4-D. a superfície do calo formada por células alongadas. b secção transversal mostrando tecido cambial ocupando a região central do calo (*seta*). c tecido cambial formado por células achatadas indicando intensa atividade meristemática (*seta*). d secção transversal mostrando a região periférica do calo com células alongadas (\*), *barra de escala*=100  $\mu$ m.

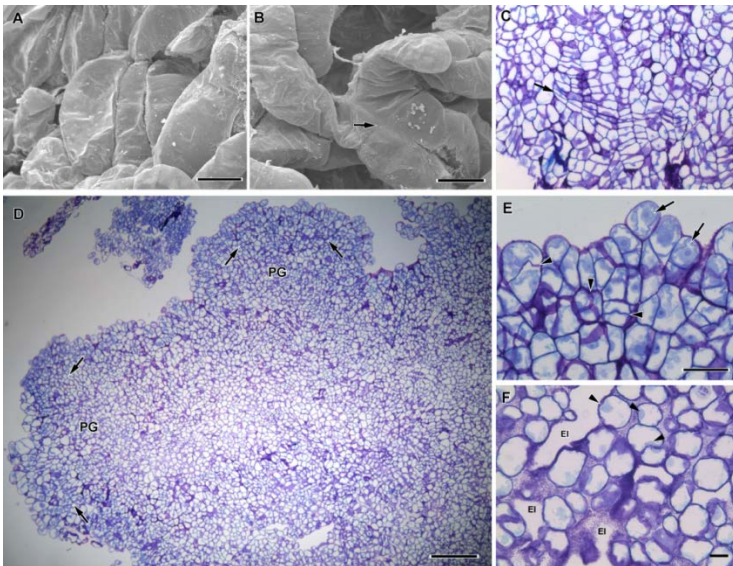
Calos induzidos a partir de explantes de raiz em 5,0 mM de 2,4-D também apresentaram a superfície constituída de dois tipos de células, células curtas e células longas (Fig. 1.6a). Estas células também estavam envolvidas por ME (Fig. 1.6b). Secções transversais revelaram que a proliferação celular ocorre a partir de células meristemáticas localizadas na região central do calo (Fig. 1.6c, d). A partir do centro do calo para a periferia observaram-se uma grande zona de expansão onde as células mais externas são as mais expandidas. A posição do núcleo estava sempre interna à massa celular, tanto em células longas quanto em células curtas (Fig. 1.6e). Os núcleos, bem como remanescentes de

protoplasto, são empurrados em direção à periferia, devido à presença de grandes vacúolos (Fig. 1.6f).



**Fig. 1. 6** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de explantes de raiz em concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. a superfície do calo formada por células curtas (*seta*) e células longas (*ponta de seta*). b células periféricas envolvidas por matriz extracelular (*setas*). c secção transversal do calo mostrando que a proliferação celular deriva de células meristemáticas da região central (*seta*). d região central do calo composta por células meristemáticas. e região periférica do calo onde as células são mais longas e a posição dos núcleos é interna ao calo em ambas as células, longas e curtas (*ponta de seta*). f região periférica do calo mostraram grandes vacúolos (v), núcleos empurrados em direção à periferia da célula (*pontas de seta*). Barras: a,c=100  $\mu\text{m}$ ; b=50  $\mu\text{m}$ ; d=10  $\mu\text{m}$ ; e,f=25  $\mu\text{m}$ .

Calos produzidos a partir de explantes de hipocótilo com concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostram somente células alongadas em sua superfície (Fig. 1.7a). Muitas destas células mostraram-se isoladas na superfície, contudo, apresentam origem comum, mantendo-se unidas na porção basal (Fig. 1.7b). Verificaram-se tecido cambial perto da periferia do calo (Fig. 1.7c, d), o qual parece ser responsável pela origem de projeções globulares (Fig. 1.7d). Estas projeções globulares são constituídas por células meristemáticas com núcleos grandes e evidência de divisões celulares em diferentes planos (Fig. 1.7e). Grandes espaços intercelulares e células com núcleos conspícuos e lúmen amplo foram observados na região central do calo (Fig. 1.7f).

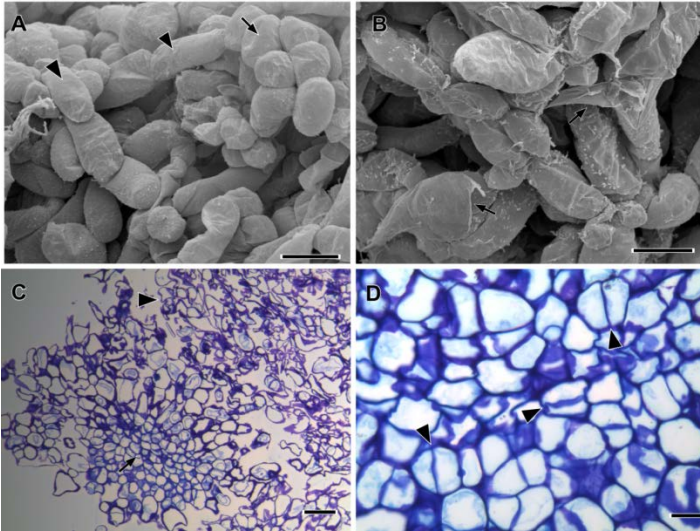


**Fig. 1. 7** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* produzidos a partir explantes de hipocótilo na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. a superfície do calo constituída por células alongadas. b células alongadas com porção basal exibindo evidência de origem comum (seta). c secção transversal



mostrando tecido cambial perto da periferia do calo (*seta*). d secção transversal mostrando a região periférica do calo com tecido cambial (*setas*), o qual parece ser responsável pela origem de projeções globulares (*PG*). e região periférica de uma projeção globular formada por células meristemáticas com núcleos grandes (*seta*) e evidências de divisão celular em diferentes planos (*pontas de seta*). f região central do calo constituída de grandes espaços intercelulares (*EI*) e células com núcleos conspícuos (*pontas de seta*) e lúmen amplo, *barra de escala* =25  $\mu\text{m}$ . Barras: a,c,e=50  $\mu\text{m}$ ; b=20  $\mu\text{m}$ , d=250  $\mu\text{m}$ , f=25  $\mu\text{m}$ .

A superfície de calos originados a partir de explantes de cotilédones, cultivados com 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, mostraram superfície com células longas e curtas (Fig. 1.8a). A predominância de células longas foi observada e algumas estavam parcialmente envolvidas por ME (Fig. 1.8b). A região central do calo mostrou-se compacta (Fig. 1.8c) com células justapostas, sem espaços intercelulares e com evidências de divisões celulares (Fig. 1.8d). Células alongadas circundam a região central do calo seguindo em diversas orientações (Fig. 1.8c). Células desconectadas e distantes da região central podem ser observadas, mas na verdade elas correspondem às células longas seccionadas transversalmente, as quais se mantêm ligadas ao calo (Fig. 1.8c).



**Fig. 1. 8** Micrografias representativas (MEV e MO) de calos de *P. setacea* induzidos a partir de explantes de cotilédone na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. a superfície do calo constituída por células longas (*puntas de seta*) e células curtas (*seta*). b células longas parcialmente envolvidas por matriz extracelular (*setas*). c secção transversal mostrando a região central do calo formada por células justapostas, sem espaços intercelulares (*seta*) e região periférica com células longas (*punta de seta*), estas se mantêm ligadas ao calo. d detalhe da região central do calo com células justapostas e evidências de divisão celular em diferentes planos (*puntas de seta*). Barras: a,b=50  $\mu\text{m}$ ; c=100  $\mu\text{m}$ ; d=25  $\mu\text{m}$ .

## 1.4 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o 2,4-D é fundamental para a indução de calos *in vitro* de *P. setacea*. Em concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D foram observadas as maiores percentagens de indução, enquanto que em 1,5  $\mu\text{M}$  ou na ausência de 2,4-D a indução foi muito baixa ou nula. Resultado semelhante foi obtido por Jiménez &

Bangerth (2001), onde o 2,4-D promoveu a indução de calos de *Daucus carota*. Haensch, (2007) também constatou que combinações sem 2,4-D não promoveram a indução de calos embriogênicos, muitas vezes, os explantes morriam ou permaneciam inalterados.

Os calos de *P. setacea* produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivadas em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e de segmentos nodais foliares e de cotilédone cultivados em 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D não mostraram características de calos embriogênicos, sendo formados em grande parte por células alongadas com espaços intercelulares e não apresentaram características potenciais para a formação de projeções globulares. O alongamento celular é característico de células inviáveis para embriogênese somática (Nogueira *et al.* 2007). No entanto, Werner *et al.* (2010) encontraram compostos fenólicos em células alongadas de calos não embriogênicos de *Caesalpinia echinata*. Em células alongadas de calos de *Coffea arabica* Pádua *et al.* (2014) encontraram grandes vesículas e vacúolos autofágicos ocupando todo o espaço citoplasmático, enquanto outras organelas estavam ausentes. Assim, a estrutura celular dos calos induzidos a partir destes tipos de explantes de *P. setacea* pode indicar que as células alongadas observadas são inviáveis para a embriogênese somática, porém, podem ser eficientes para estudos sobre o armazenamento de metabólitos secundários.

Calos de segmento nodal foliar cultivado em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e calos de raiz e de hipocótilo cultivados em 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram aspectos de calos não embriogênicos e de calos embriogênicos por apresentarem células curtas, com núcleo conspicuo, indicando potencialidade mitótica, ao lado das características acima mencionadas. Estas características coincidem com as observadas por vários autores que as definem como de ocorrência comum em células viáveis de calos embriogênicos. Pádua *et al.* (2014) também encontraram

células isodiamétricas com um núcleo e nucléolo evidente em calos friáveis de *Coffea arabica*. Em culturas embriogênicas de *P. cincinnata* o padrão de células meristemáticas detectado durante a indução de calo contribuiu para a formação de protuberâncias (Rocha *et al.* 2012b). Além destas características, calos de *P. setacea* originados de segmento nodal foliar em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e de hipocótilo em 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D mostraram tecido cambial auxiliando na formação de projeções globulares. Calos derivados de segmento nodal foliar em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, além de tecido cambial, mostraram elementos traqueais dispostos em forma de arco, o que deve facilitar a condução de nutrientes para as células periféricas do calo. Rocha *et al.* (2012b) também observaram tecidos vasculares dentro das protuberâncias e concluiu que eles auxiliam na formação de áreas pró-embriogênicas. Neste tipo de calo observaram-se também a presença de células com lúmen amplo e grandes espaços na região interna ao tecido cambial, o que sugere a possibilidade de acumulação de compostos fenólicos. Palacio *et al.* (2012) examinaram calos de *Larrea divaricata* em diferentes níveis de diferenciação e descobriram que a produção de compostos fenólicos aumentou significativamente em calos organogênicos.

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que os calos de *P. setacea* apresentaram regiões completamente ou parcialmente envolvidas por matriz extracelular (ME) unindo células. Esta estrutura também foi observada por outros autores (Samaj *et al.*, 1995; Verdeil *et al.*, 2001; Konieczby *et al.*, 2005; Popielarska-Konieczna *et al.*, 2010; Bevitore *et al.*, 2014). Samaj *et al.* (1995) constataram que esta ME conspícua está presente ao redor e entre as células de calos embriogênicos. Bevitore *et al.* (2014) observaram esta deposição em ambos os calos, embriogênicos e não embriogênicos, corroborando com o padrão observado em calos de *P. setacea*.

Samaj *et al.* (1995), num estudo com culturas primárias de *Drosera rotundifolia* e *Zea mays* concluiu que a ME é uma estrutura morfológica estável mesmo em culturas de longo prazo. Estes autores encontraram, através de tratamento com protease que as proteínas são componentes importantes apresentar na superfície da ME. Verdeil *et al.* (2001) utilizaram anticorpos monoclonais em calos de côco e através de MEV identificaram a pectina como outro componente da ME. Em calos de *P. setacea* a presença de ME cobrindo as células foi melhor evidenciada em MEV do que em microscopia óptica estando de acordo com Konieczny *et al.* (2005). No entanto, em calos de *P. setacea* foi demonstrado com êxito a eficácia do reagente vermelho de rutênio para a identificação de substâncias pécticas na ME. Verdeil *et al.* (2001) também observaram que o aparecimento de material cobrindo as células está associado com a aquisição de competência embriogênica de calos de côco. Neste caso, as células individuais ou grupos embriogênicos encontravam-se cercadas por uma parede externa espessa, a qual as separava de tecidos degenerativos.

A natureza química da ME em culturas *in vitro* ainda não é totalmente conhecida, porém os principais componentes são proteínas (Samaj *et al.*, 1995) e substâncias pécticas, identificadas tanto por Verdeil *et al.* (2001) como neste estudo, sugerindo que a ME é formada por substâncias derivadas da degeneração da lamela média, indicando um defeito na adesão celular. Esta ME também pode ser do tipo membranosa ou fibrilar, como observado por Bevitore *et al.* (2014), apesar de sua natureza química permanecer a mesma. Popielarska-Konieczna *et al.* (2010) indicaram que a função da ME na cultura de tecidos é participar da recepção e transdução de sinais, auxiliando no reconhecimento e determinação do destino da célula.

## 1.5 REFERÊNCIAS

Alves ECS, Xavier A, Otoni WC (2004). Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore** **28**: 643-653

Ataíde EM, Oliveira JC, Ruggiero C (2012). Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D. C. cultivado em Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura** **34**: 377-381

Bernacci LC, Cervi AC, Milward-de-Azevedo MA, Nunes TS, Imig DC, Mezzonato AC (2015). *Passifloraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>). Accessed 02 jan 2015

Bevitore R, Popielarska-Konieczna M, Santos EM, Grossi-de-Sá ME, Petrofeza S (2014). Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma** **251**: 545-554

Braga MF, Santos EC, Junqueira NTV, Sousa AATC, Faleiro FG, Rezende LN, Junqueira KP (2006). Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura** **28**: 284-288

Busilacchi H, Severin C, Gttuso M, Aguirre A, Di Sapiro O, Gattuso S (2008). Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas** **7**: 257-263

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 1-23

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga M F, Oliveira EJ, Peixoto JR, Costa AM (2011). **Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro: Histórico e Perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados

Ferreira FR (2005). Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, pp 41-51

Fiebich BL, Knörle R, Appel K, Kammler T, Weiss G (2011). Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): *in vitro* and *in vivo* evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia 82**: 474-480

Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, Vidoti GJ, Oliveira AJB (2008). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia 18**: 627-641

Ge X, Chu Z, Lin Y, Wang S (2006). A tissue culture system for different germplasms of indica rice. **Plant Cell Reports 25**: 392-402

Gerrits & Smid (1983). A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Jornal of Microscopy 132**: 81-85

Gerlach D (1984). **Botanische mikrotechnik**. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Haensch KT (2007). Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Loyal. **Journal of Biotechnology** **10**: 69-77

Isutsa DK (2004). Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae** **99**: 395-400

Jiménez & Bangerth (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum** **111**: 389-395

Junqueira NTV, Braga MF, Faleiro FG, Peixoto JR, Bernacci LC (2005). Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Org.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, EMBRAPA Cerrados, pp 81-106

Konieczny R, Bohdanowicz J, Czaplicki AZ, Przywara L (2005). Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture. **Plant Cell Tissue Org Cult** **83**: 201-208

Marlière LDP, Ribeiro AQ, Brandão MGL, Klein CH, Acurcio FA (2008). Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia** **18**: 754-760

Meletti LMM, Furlani PR, Álvares V, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Filho JAA (2002). As novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O agrônomo**, **54**: 30-33



Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.

**Physiologia Plantarum 15:** 473-497

Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture 118:** 1-16

Nogueira RC, Paiva R, Porto JMP, Nicioli PM, Stein VC, Deuner S, Alves E (2007). Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências 5:** 48-50

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964). Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma 59:** 368-373

Oliveira JC, Ruggiero C (2005). Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Org.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, EMBRAPA Cerrados, 143-158

Ozarowski M, Thiem B (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy 23:** 937-947

Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012). Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae 144:** 42-47.

Padua MS, Paiva LV, Silva LC, Livramento KG, Alves E, Castro AHF (2014). Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural** **44**: 660-665

Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica** **20**: 257-264.

Palacio L, Cantero JJ, Cusidó R, Goleniowski M (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science** **193-194**: 1-7

Peres LEP (2002). Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento** **25**: 44-48

Pinto PDL, Almeida AMR, Rego MM, Silva ML, Oliveira EJ, Oton WC (2011). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **107**: 521-530

Pipino L, Braglia L, Giovannini A, Fascella G, Mercuri A (2008). *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants** **8**: 47-49

Popielarska-Konieczna M, Bohdanowicz J, Starnawska E (2010). Extra-cellular matrix of plant callus tissue visualized by ESEM and SEM. **Protoplasma** **247**: 121-125

Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** **20**: 101-153

Ribeiro AQ, Leite JPV, Dabtas-Barros AM (2005). Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira Farmacognosia 15**: 65-70

Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012a). Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture 111**: 69-78

Rocha, DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012b). Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma 249**: 747-758

Samaj MB, Bobak M, Blehova A, Kristin J, Auxtová-Samajová O (1995). Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. **Protoplasma 186**: 45-49

Santos FC, Ramos JD, Pasqual M, Rezende JC, Santos FC, Villa F (2010). Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres 57**: 112-117

Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LC, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011). Organogenesis from root explantes of commercial population of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tiss Organ Cult 107**: 407-416

Silva ML, Pinto DLP, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009). A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tiss Organ Cult 99**: 47-54

Sokal RR, Rohlf FJ (1981). **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research, San Francisco: W H Freeman, 859 p.

Verdeil JL, Hoher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, Nicole M (2001). Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany 88**: 9-18

Villareal ML, Arias C, Vega J, Feria-Velasco A, Ramirez OT, Nicasio P, Rojas G, Quintero R (1997). Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum*: a plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tiss Org Cult 50**: 39-44

Werner ET, Milanez CRD, Mengarda LHG, Vendrame WA, Cuzzuol GRF (2010). Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasilica 24**: 1046-1051

## 2. CAPÍTULO II

### **INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA, METABÓLICA E ULTRAESTRUTURAL DE CALOS DE *Passiflora tenuifila* Killip (PASSIFLORACEAE)**

#### **RESUMO**

*Passiflora tenuifila*, espécie silvestre de maracujazeiro e, endêmica do Brasil, têm sido indicada ao melhoramento genético, devido à resistência a doenças e patógenos. Além disso, possui grande potencial para incorporação no mercado consumidor de frutos e fins medicinais. A finalidade deste trabalho foi determinar possíveis efeitos de diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) e fontes de Carbono (sacarose, glicose e frutose) sobre a indução, a partir de segmentos caulinares, e desenvolvimento *in vitro* de calos de *P. tenuifila* caracterizando-os quanto à morfo-histologia, ultraestrutura e teores de metabólitos. Nos diferentes tratamentos de indução foram determinados: percentagem de indução, teor de água e acúmulo de biomassa. Amostras de calos induzidos em ANA em diferentes fontes de Carbono foram fixadas em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, desidratadas, infiltradas em hidroxietilmetacrilato, seccionadas em micrótomo, coradas com azul de toluidina ou submetidas à reação com vermelho de rutênio, para identificação de natureza química de estruturas, e analisadas em microscopia óptica. Para análise em microscopia eletrônica de varredura algumas amostras foram secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub> e, para análise em microscopia eletrônica de transmissão outras amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, desidratadas, infiltradas em resina Spurr, seccionadas em ultramicrótomo, contrastadas com Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo e analisadas em Microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados

obtidos mostraram que todas as fontes de carbono e concentrações de ANA permitiram altas percentagens de calos (85,8% à 100%), sem diferenças significativas entre os tratamentos. Os calos, todos com textura friável, apresentaram características histológicas similares: superfície envolvida parcialmente por matriz extracelular; centros de origem com células meristemáticas na região interna, alguns elementos traqueais diferenciados e células frouxamente unidas na região periférica. Compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides (luteína, zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno) foram detectados mostrando o potencial dos calos de *P. tenuifila* para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico. Contudo, técnicas que visem o aumento das concentrações destas substâncias devem ser exploradas. Recomenda-se a aplicação de técnicas para a elicitação das culturas e o aumento do tempo de manutenção dos calos *in vitro* favorecendo o maior desenvolvimento e a diferenciação celular.

**Palavras-Chave:** cultura *in vitro*, metabólitos secundários, morfo-histologia, fontes de carbono

## ABSTRACT

*Passiflora tenuifila*, a wild specie of passion fruit and endemic to Brazil, has been nominated for the genetic improvement due to resistance to diseases and pathogens. This passion fruit has also a great potential for incorporation into the consumer market due your medicinal purposes and quality of your fruits. The subject of this study was to determine possible effects of different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) and sources of carbon (sucrose, glucose and fructose) on induction from stem segments, and in vitro development of *P.tenuifila* callus. For this, the callus was characterized about the morphological and histology, ultrastructure and metabolites levels. In the differents treatments were determined: percentage of explants that induced callus, water content and biomass accumulation. Samples of callus induced in NAA and different sources of carbon were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, dehydrated, infiltrated in methacrylate, sectioned in microtome, stained with toluidine blue or submitted to reaction with ruthenium red, to identify pectic substances, and analyzed with optical microscopy. For analysis in scanning electron microscopy some samples were dried in a critical point of CO<sub>2</sub>, and for analysis in transmission electron microscopy other fixed specimens were post-fixed in osmium tetroxide, dehydrated, infiltrated in Spurr resin, sectioned with ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in a transmission electron microscope. The results showed that all sources of carbon and NAA concentrations allowed the induction of high percentages (85.8% to 100%), without significant differences between treatments. Callus, all with friable texture, had similar histological characteristics: surface surrounded by extracellular matrix; centers of origin with meristematic cells in the inner region, some differentiated tracheal elements and loosely attached cells

in the peripheral region. Phenolic compounds, flavonoids and carotenoids (lutein, zeaxanthin and  $\alpha$ -carotene) were detected demonstrating the potential of *P. tenuifila* callus for the production of secondary metabolites of pharmacological interest. However, techniques aimed at increasing concentrations of these substances should be explored. It's recommended that the application of techniques for the elicitation of crops and increasing the holding time of the callus in vitro promoting the further development and cell differentiation.

**Key words:** *in vitro* culture, secondary metabolites, morphological and histology, carbon sources



## 2.1 INTRODUÇÃO

*Passiflora tenuifila* é uma espécie silvestre de maracujá, endêmica do Brasil, que ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, estando presente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Bernacci *et al.*, 2015). Possui frutos de casca amarelo-laranjada e de polpa amarela, com baixa acidez e alto teor de sólidos solúveis, características interessantes para a incorporação no mercado consumidor (Braga *et al.*, 2005). Adicionalmente, apresenta resistência a doenças e patógenos, como à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* PV. *Passiflorae*) e à verrugose (*Cladosporium herbarum*) podendo ser utilizada em programas de melhoramento genético (Braga *et al.*, 2005). Além disso, como as demais espécies do gênero, também apresenta potencial para uso medicinal (Faleiro *et al.*, 2011).

Investigações fitoquímicas de *P. incarnata* e de *P. edulis*, e várias análises ocasionais em outras espécies, revelaram que os membros deste gênero contêm substâncias bioativas importantes como alcalóides, fenóis, compostos cianogênicos e glicosil-flavonóides entre outros (Drawan *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2011). Além disso, possuem propriedades sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas e antitumorais, sendo também recomendadas no tratamento de dependência química, obesidade e controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (Petry *et al.*, 2001; Akhondzadeh *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 2004; Costa & Tupinambá, 2005; Ingale & Hivrale, 2010; Zeraik *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011).

Embora as substâncias encontradas nos maracujazeiros sejam utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos consumidos em vários países (Drawan *et al.*, 2004; Fiebich *et al.*, 2011; Ozarowski and Thiem, 2013), poucos dados sobre a produção de compostos bioativos através da cultura de tecidos *in vitro*

estão disponíveis para o gênero *Passiflora* (Lugato *et al.*, 2014). Antognoni *et al.* (2007) salienta que esta metodologia possui potencial para a produção em larga escala sob condições rigorosamente controladas, o que tem atraído a atenção de cientistas. Ressaltam, contudo, que muitas vezes o rendimento final é baixo para tornar esta alternativa viável quando comparada com a extração de plantas cultivadas em campo.

Por este motivo, são necessárias investigações que visem estabelecer os sistemas de cultura de células e de plantas *in vitro*, conhecer vias biossintéticas ou simplesmente encontrar abordagens práticas para aumentar o rendimento da produção de metabólitos secundários (Atognoni *et al.*, 2007). O primeiro estágio para a produção de metabólitos secundários *in vitro* é o estabelecimento de culturas de células e órgãos para o crescimento, multiplicação e acúmulo de biomassa (calos) e o segundo, se refere à síntese de metabólitos a partir dos calos (Murphy *et al.*, 2014). Os calos são obtidos a partir do crescimento descoordenado e desorganizado de pequenos órgão vegetais, de pedaços de tecidos vegetal, ou de células previamente cultivadas, em condições estéreis (George, 2008b). Contudo, para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de determinada espécie, informações como a composição do meio de cultura são preliminarmente requeridas (Santos 2010).

A fim de sobreviver *in vitro*, os explantes e outros tipos de culturas devem ser cultivados em um meio contendo sacarose ou outra fonte de carbono (George, 2008). Isto porque inicialmente não são capazes de produzir sua própria exigência de matéria orgânica por meio da fotossíntese e passam por um período de transição antes que do crescimento independente (George, 2008). Outro importante fator para o sucesso no estabelecimento de culturas *in vitro* é o enriquecimento do meio de cultura através da utilização de auxinas sintéticas como o ácido 1-naftalenoacético (ANA) (Gaspar *et al.*,

1996). As auxinas têm importante papel nos processos de alongamento celular, início da divisão celular, definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (Gaspar *et al.*, 1996). Reguladores de crescimento endógenos ou substâncias químicas adicionadas ao meio de cultura estimulam a divisão celular de células indiferenciadas (George, 2008).

Até o momento não foram encontradas pesquisas sobre o estabelecimento de calos *in vitro* de *P. tenuifila*, tão pouco sobre as características histológicas e conteúdos de metabólitos secundários de culturas primárias. Tendo em vista o potencial no uso como planta medicinal e no melhoramento genético, torna-se essencial obter informações sobre o cultivo *in vitro* desta espécie. Assim, este estudo teve por finalidade determinar possíveis efeitos de diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) e fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose) sobre a indução e desenvolvimento de calos de *P. tenuifila*, caracterizando-os quanto à histologia, teores de metabólitos secundários e atividade antioxidante.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 MATERIAL VEGETAL**

Foram usados calos de *P. tenuifila* produzidos a partir de segmentos caulinares obtidos de plantas axênica jovens. Estas plantas foram produzidas *in vitro* a partir do cultivo de ápices caulinares de plantas adultas.

#### **2.2.1.1 Produção de plantas jovens *in vitro* a partir de ápices caulinares**

Ápices caulinares de *P. tenuifila* foram coletados de plantas com 60 dias de idade, cultivadas em casa de vegetação. Os ápices foram lavados com água da torneira e detergente neutro, enxaguados quatro vezes e, em fluxo

laminar, foram imersos por 1 min e 30 seg em álcool 70%, lavados três vezes em água destilada esterilizada, imersos por 2 min e 30 seg em solução comercial de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, com algumas gotas de detergente. Em seguida, foram enxaguados, por quatro vezes, com água destilada esterilizada e inoculados em meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), 0,2% (m/V) de Phytigel e com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  utilizando-se HCl (1N) e NaOH (1N), seguindo-se com a esterilização, por 18 min, a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,1 \text{ Kg/cm}^3$ . Após a inoculação, os tubos de ensaio foram selados com filme de polipropileno e mantidos em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de  $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e umidade relativa de 70%. Após 135 dias, os segmentos caulinares dos ramos resultantes do alongamento *in vitro* dos ápices caulinares, foram utilizados como explantes para a indução de calos.

### **2.2.1.2 Indução de calos a partir de segmentos caulinares**

Segmentos caulinares, com cerca de 1 cm de comprimento, foram excisados dos caules resultantes do alongamento de ápices caulinares. Testes preliminares revelaram que outros tipos de explantes não mostraram-se eficientes na formação de calos. Em seguida, foram inoculados no meio de cultura. O meio de Murashige e Skoog (1962) com 0,2% (m/V) de Phytigel foi suplementado com três diferentes fontes de carbono – 88,5 mM de sacarose (Sac), 88,5 mM de frutose (Fru) e 88,5 mM de glucose (Glu) – e para cada fonte de carbono foram usadas três diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) –  $1,25 \mu\text{M}$ ,  $2,5 \mu\text{M}$  e  $5,0 \mu\text{M}$ , totalizando, assim, nove tratamentos. Testes preliminares revelaram que sem uso de ANA não ocorria formação de calos. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , utilizando-se

HCl (1N) e NaOH (1N), e esterilizado, por 18 min, a 121°C e 1,1 Kgf.cm<sup>3</sup>. Foram feitas 4 repetições com média de 30 segmentos caulinares por tratamento. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL (22,3 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e umidade relativa de 70%. A percentagem de indução de calos foi avaliada após 40 dias de cultivo *in vitro*.

### 2.2.2 TEOR DE ÁGUA E ACÚMULO DE BIOMASSA DOS CALOS OBTIDOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Para determinar a massa fresca dos calos (MF), explantes+calos, com 45 dias de cultivo *in vitro*, foram coletados e determinada a massa fresca imediatamente após a remoção do meio de cultura. Para determinar a massa seca (MS) os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, mantidos em estufa por 24 h a 60°C. O teor de água (TA) foi expresso em percentagem de MF, através da seguinte fórmula (Laudano, 2005):  $TA (\% MF) = [(MF - MS) / MF].100$ . Para determinar o acúmulo de biomassa nos diferentes tratamentos foi calculada a relação MS/MF. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o ASSISTAT (versão 7.7; Silva, 2009).

### 2.2.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS

Para análise de metabólitos foram utilizados calos com 45 dias de cultivo *in vitro*, mantidos em nitrogênio líquido (-196°C). Os explantes foram retirados do interior dos calos. Os calos foram homogeneizados e em pacotes de alumínio separou-se a quantidade de massa fresca

necessária para cada tipo de análise sendo armazenados em refrigerador (-80° C).

### **2.2.3.1 Extração e dosagem de açúcares solúveis totais**

A extração de açúcares solúveis totais seguiu metodologia proposta por Shannon (1968). Foram maceradas 300 mg de massa fresca de calos de cada tratamento, com auxílio de cadinho e pistilo, e adicionados 2 mL da solução MCW (metanol : clorofórmio : água) (12:5:3, v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm) por 5 min. Após coleta do sobrenadante, o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (5 min, 4000 rpm). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e procedeu-se nova centrifugação do extrato. A fase superior de cada extrato foi coletada e utilizada para análise dos açúcares. O resíduo de cada amostra foi utilizado para dosagem de amido descrita no item 2.2.3.2.

A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit & Burris (1964). Aliquotas de 1 mL do extrato com 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado) foram agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria, a 100° C, por 3 min. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53). A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (25 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $r^2= 0,9906$ ;  $y = 0,0139x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

### **2.2.3.2 Extração e dosagem de amido**

A metodologia descrita por McCready *et al.* (1950) foi utilizada para determinar o teor de amido. Ao resíduo da centrifugação do extrato estabelecido conforme o item 2.2.4.1, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 %

(v/v). A solução foi centrifugada (5 min, 4000 rpm). O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 min, 4000 rpm). Os sobrenadantes foram reunidos. A dosagem do amido seguiu o método de Umbreit & Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 min. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53). A quantificação do amido foi feita a partir da curva padrão de galactose em ácido perclórico (0,025 a 0,5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,9424$ ;  $y = 0,1695x$ ). Os resultados foram expressos em mg de galactose por g de massa seca.

### **2.2.3.3 Compostos fenólicos totais e flavonóides**

Para determinar fenólicos totais e flavonóides, uma grama de massa fresca de cada amostra foi macerada em 10 mL de solução de metanol 80% (MeOH 80%). Após uma hora de repouso, ao refúgio da luz, a amostra foi centrifugada (10 min, 4000 rpm) A análise dos compostos fenólicos foi realizada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu baseado em Schiavon *et al.* (2012), com modificações. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de extrato foram incubadas com 75  $\mu\text{L}$  de reativo de Folin-Ciocaltau e 825  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 2% (m/v) durante 1 hora, no escuro. Após esse tempo, a absorbância (750 nm) do meio de reação foi determinada em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53) e a quantificação dos compostos fenólicos totais foi calculada via curva padrão de ácido gálico (10 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $r^2=0,9949$ ;  $y=0,0045x$ ). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de massa seca.

Os flavonóides foram determinados de acordo com o método de Zacarias *et al.* (2007). Em tubos de ensaio foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de extrato da amostra, 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de cloreto de alumínio 2%. Seguiu-se com a homogeneização do meio de reação e manutenção em repouso por uma hora na ausência de luz. As leituras foram feitas a 420 nm em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53). A quantificação dos flavonóides foi realizada a partir da curva padrão de quercetina (10 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $r^2=0,9909$ ;  $y = 0,0100x$ ). As leituras foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de quercetina por g de massa seca.

#### 2.2.3.4 Carotenóides

A concentração dos carotenoides foi realizada com base na metodologia descrita por Kuhnen *et al.* (2010). Cerca de uma grama de massa fresca de cada amostra foi macerada em 10 mL de metanol P.A (100%). Após repouso de uma hora, na ausência de luz, as amostras foram centrifugadas (10 min, 4000 rpm). Posteriormente, o extrato foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC - 10A), equipado com coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5  $\mu\text{m}$ ) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. Para eluição utilizou-se metanol: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina,  $\beta$  e  $\alpha$  - caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. Para quantificação dos carotenóides utilizou-se a curva padrão externa de luteína (2,5 a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 7044x$ ) e  $\beta$  - caroteno (0,01 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1019x$ ) e considerou-se a área dos



picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de carotenóides foi expressa em mg por g de massa seca.

### **2.2.3.5 Atividade Antioxidante por DPPH**

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos compostos antioxidantes presentes na amostra através do método de Kim *et al.* (2003). O extrato foi preparado com uma grama de amostra fresca macerada com 10 mL de metanol 80%. Após permanecerem em repouso por uma hora, ao refúgio da luz, as amostras foram centrifugadas (5 min, 4000 rpm). Paralelamente, uma solução DPPH/ metanol (1 ml de DPPH: 99 ml de metanol 80%) foi preparada de modo que apresentasse absorvância entre 500 e 600 nm ( $\lambda_0 = 541$  nm). Posteriormente, adicionou-se 0,5 ml do extrato em 2,5 ml da solução DPPH/ metanol, mantendo em repouso por 30 min. As leituras foram feitas à 515 nm em espectrofotômetro. A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação: % de descoramento do DPPH =  $[(AC-AA)/AC].100$ , onde AC é a absorvância do controle e AA é a absorvância da amostra.

### **2.2.3.6 Clorofila**

A clorofila foi dosada conforme metodologia descrita por Hiscox & Israelstam (1979). Aproximadamente 300 mg de calos de todos os tratamentos foram triturados e macerados em nitrogênio líquido, com o auxílio de cadinho e pistilo, e transferidos para tubos falcon, com adição de 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos abertos foram mantidos abertos em estufa a 45°C, por 45 min, seguindo-se a centrifugação (10 min a 4000 rpm). O extrato foi

cuidadosamente transferido para novos tubos de ensaio. Para a análise, 3 mL de amostra foram colocados em uma cubeta de vidro e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53), em 645 e 663 nm. As análises foram realizadas em triplicata e para a quantificação das clorofilas foi utilizada a Fórmula de Arnon (1949):

$$\text{mg.mL}^{-1} \text{ de clorofila a} = 0,0127.D_{663} - 0,00269.D_{645}$$

$$\text{mg.mL}^{-1} \text{ de clorofila b} = 0,0229.D_{645} - 0,00468.D_{663}$$

## 2.2.4 TEXTURA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

Os calos foram classificados como de textura friável ou compacta. O calo foi considerado friável quando apresentava aglomerados de células que facilmente se destacavam ao toque da pinça. Quando o calo mostrava estrutura rígida, difícil de seccionar ou de destacar células, foi considerado compacto. Amostras frescas representativas dos calos foram coletadas após 20, 40 e 60 dias de cultivo *in vitro* e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e processadas para diferentes tipos de microscopia.

### 2.2.4.1 Microscopia óptica (M0)

Para os estudos histológicos, as amostras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e desidratadas em série etílica (Gerrits & Smid, 1983), infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Secções, com 3  $\mu\text{m}$  de espessura, foram obtidas em micrótomato rotativo Leica RM 2125 RT (Nussloch, Alemanha) e distendidas sobre lâminas, contendo água, em chapa aquecedora (42°C) e, posteriormente coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). Lâminas permanentes foram

confeccionadas com verniz vitral incolor 500® (Paiva *et al.* 2006). As imagens foram capturadas através de Microscópio DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça).

#### **2.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Amostras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e desidratadas em série etílica até 100° GL. Após, foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> Leica® EM-CDP-030 (Heidelberg, Germany), conforme metodologia de Horridge & Tamm (1969), e recobertas com 20 nm de ouro paládio em metalizador EM SCD (Leica, Viena, Áustria). As imagens foram capturadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol XL30 (Tokyo, Japão), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

#### **2.2.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Amostras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio, na mesma solução tampão, seguindo com a desidratação gradual em acetona até 100%. Posteriormente, foram infiltradas em resina Spurr (Spurr, 1969). O material foi seccionado em ultramicrótomo com 50 nm de espessura, alocado sobre grades de cobre contrastado com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). O material foi observado e documentado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca Jeol, modelo JEM-1011(Tokio, Japão), no LCME-UFSC.

### 2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram montados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com separação de médias pelos testes T-student ou Tukey. Dados não normais foram submetidos ao método não paramétrico com teste Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software ASSISTAT 7.7 (Silva & Azevedo, 2009).

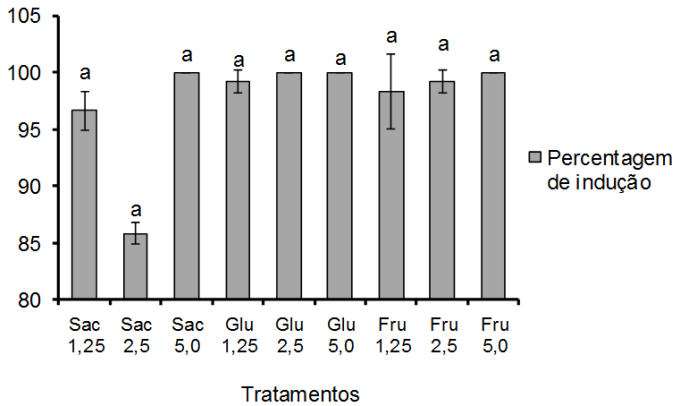
## 2.3 RESULTADOS

As fontes de carbono e concentrações de ANA testadas mostraram-se eficientes para a produção de calos de *P. tenuifila*, permitindo percentagens de indução expressiva, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 2.1).

Por outro lado, observaram-se distinções no acúmulo de biomassa e no teor de água dos calos, dependendo da fonte de carbono e da concentração de ANA. O uso de sacarose possibilitou a formação de calos com maior acúmulo de biomassa seca por unidade de biomassa fresca e com menor teor de água em relação aos calos produzidos em meio de cultura contendo glicose e frutose (Tab. 2.1). Entre todos os tratamentos, a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA associadas à sacarose, foi a concentração que apresentou maior biomassa seca por mg de massa fresca e menor conteúdo de água (Tab. 2.1).

A variação no acúmulo de biomassa seca por mg de biomassa fresca pode, ainda, ser visualizada com base nos aspectos morfo-histológicos dos calos. Estes mostraram-se mais volumosos quando induzidos com glicose e frutose em relação aos induzidos em meio de cultura suplementado com sacarose, fato mais evidente quando utilizadas menores concentrações de ANA (Fig. 2.2). Independente da fonte de carbono, concentração de ANA ou dias de cultivo *in vitro*, todos os calos

apresentaram textura friável exibindo aglomerados celulares tenros que facilmente destacavam-se ao toque da pinça e, características histológicas similares. A superfície dos calos mostrou-se constituída por dois tipos celulares, células curtas (Fig. 2.3 a, b) e células longas (Fig. 2.3 a, c), as quais encontraram-se parcialmente ou totalmente envolvidas por matriz extracelular (ECM, Fig. 2.3d). Estas células mantiveram seu núcleo periférico, decorrente de ampla ocupação por vacúolo, mas mostraram evidências de divisões na base (Fig. 2.3e). Algumas células alongaram-se perpendicularmente à superfície originando células longas (Fig. 2.3f). Na porção mais interna dos calos ocorreram vários centros de origem (Fig. 2.4a). Estes centros estavam constituídos por células meristemáticas, com protoplasto denso, correspondendo a um tecido provascular de aparência compacta (Fig. 2.4b), ocorrendo também elementos traqueais já diferenciados (Fig. 2.4 b,c). Análise ultraestrutural revelou que as células que contornavam os tecidos provasculares apresentaram núcleo e nucléolo conspícuos e início de processo de vacuolarização (Fig. 2.4d). A região mais periférica estava constituída por células frouxamente unidas (Fig. 2.4a). As quais eram geralmente mais vacuoladas, com protoplasto periférico rico em organelas, como mitocôndrias e golgi (Fig. 2.4 e,f). Nestas células também ocorreram alguns corpos eletrodensos podendo corresponder a compostos fenólicos (Fig. 2.4e) e amiloplastos (Fig. 2.4g).

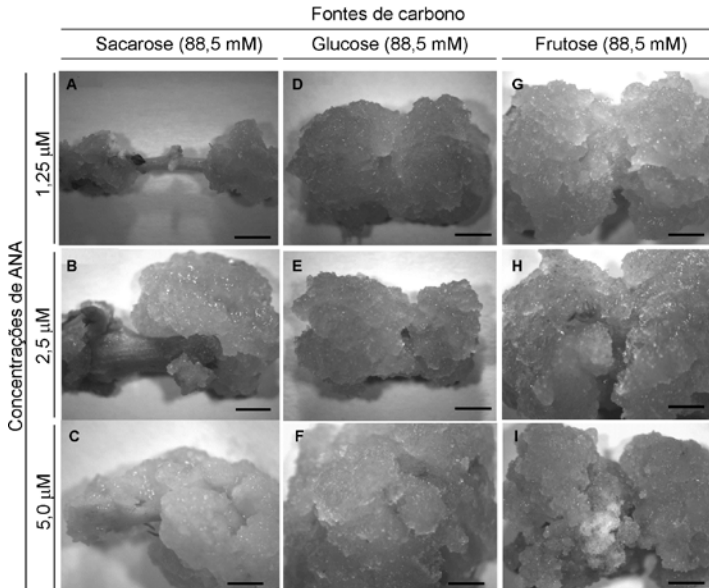


**Fig. 2. 1** Percentagens de explantes que formaram calos de *P. tenuiflora* em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). Os dados representam as médias de quatro repetições seguidas de desvio padrão, letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

**Tab.2. 1** Teor de água e razão de biomassa seca/ biomassa fresca em calos de *P. tenuifila* induzidos a partir de segmentos caulinares cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose, glucose ou frutose e diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). Dados após 45 dias de cultivo

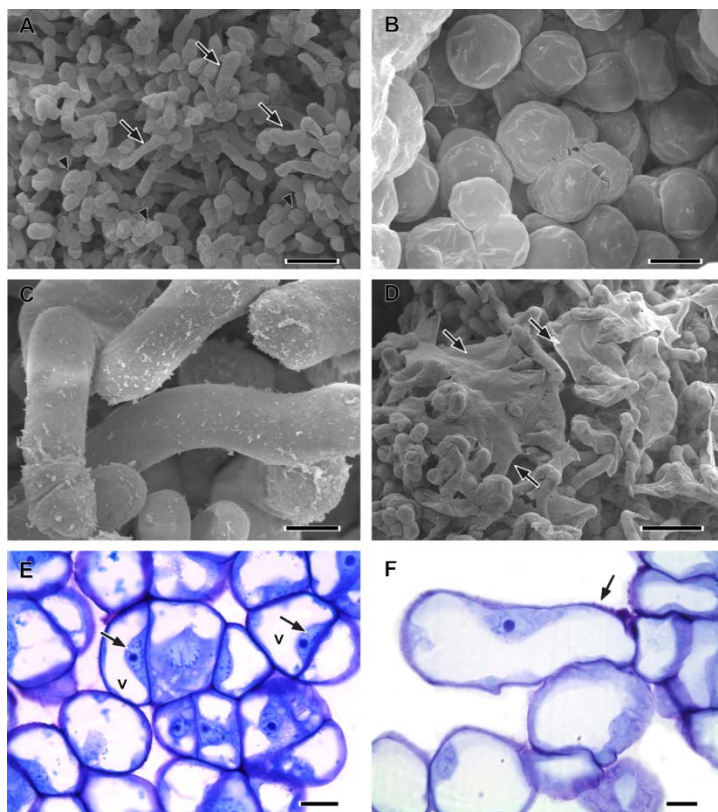
Fonte de Carbono (88,5 mM)	ANA ( $\mu$ M)	MF(mg) <sup>y</sup>	MS(mg) <sup>y</sup>	Razão MS/MF <sup>y</sup>	Teor de água (% MF) <sup>y</sup>
Sacarose	1,25	924,8	80,0	0,089 $\pm$ 0,010 b	91,15 $\pm$ 1,23 c
	2,5	610,5	66,5	0,110 $\pm$ 0,005 a	89,03 $\pm$ 0,95 d
	5,0	785,9	73,5	0,093 $\pm$ 0,005 b	90,68 $\pm$ 0,70 c
Glucose	1,25	1164,3	54,3	0,047 $\pm$ 0,012 d	95,34 $\pm$ 0,48 a
	2,5	1063,5	55,4	0,052 $\pm$ 0,005 cd	94,75 $\pm$ 0,48 ab
	5,0	1063,3	50,2	0,049 $\pm$ 0,007 d	95,11 $\pm$ 0,90 a
Frutose	1,25	817,9	46,7	0,057 $\pm$ 0,007 c	94,31 $\pm$ 0,70 b
	2,5	1082,4	56,6	0,053 $\pm$ 0,009 cd	94,73 $\pm$ 0,47 ab
	5,0	1018,0	50,4	0,049 $\pm$ 0,010 d	95,09 $\pm$ 1,03 a

<sup>y</sup> Médias de dez repetições seguidas de desvio padrão  $\pm$ , letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MF=massa seca, mM=milimolar ( $10^{-3}$ ),  $\mu$ M=micromolar ( $10^{-6}$ ), mg=miligrama ( $10^{-3}$ ), g=grama.

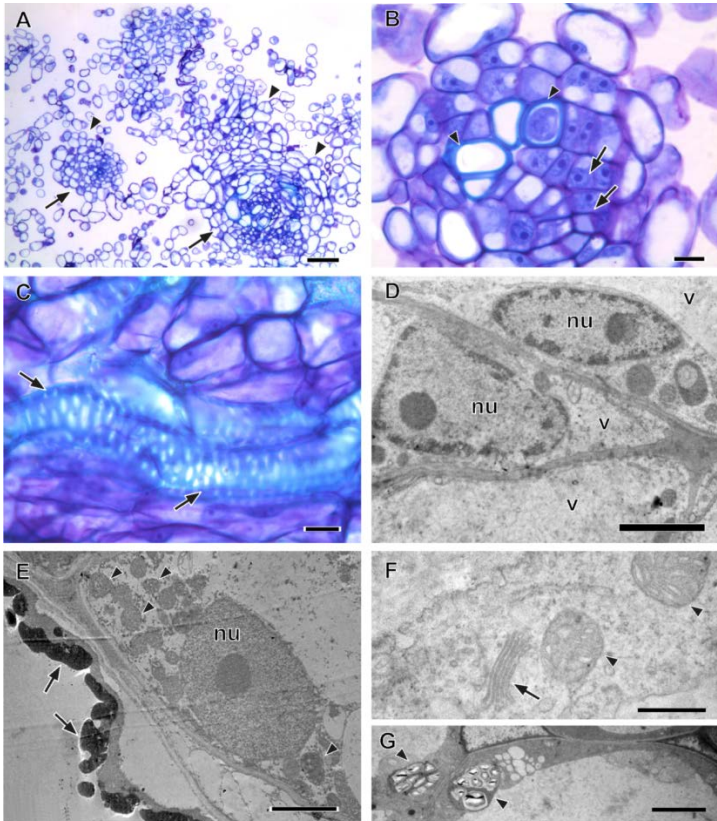


**Fig. 2. 2** Aspecto geral de calos friáveis de *P. tenuifila* induzidos a partir da cultura de segmentos caulinares em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). Calos induzidos em sacarose nos seguintes dias de cultivo *in vitro*: a 20 dias; b 40 dias; c 60 dias. Calos induzidos em glucose: d 20 dias; e 40 dias; f 60 dias. Calos induzidos em frutose: g 20 dias; h 40 dias; i 60 dias. Barra = 2mm.





**Fig. 2. 3** Micrografias representativas de calos de *P. tenuifila* (MEV e MO), induzidos a partir de diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). a superfície constituída por células curtas (ponta de seta) e células longas (setas) em calo induzido em sacarose, 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 20 dias. b detalhe de células curtas (calo em glucose, 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 60 dias). c detalhe de células longas (calo em glucose, 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias). d células envolvidas por matriz extracelular (setas), calo em frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias). e células com núcleo periférico (setas) e amplo vacúolo (v), calo em sacarose 5  $\mu\text{M}$  de ANA, 60 dias. f célula em alongamento (seta), calo em sacarose 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 20 dias. Barras: a=100  $\mu\text{m}$ ; b,c=20  $\mu\text{m}$ , d=50  $\mu\text{m}$ ; e=12  $\mu\text{m}$ ; f=10  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 2. 4** Micrografias representativas de calos de *P. tenuifila* (MO e MET), induzidos a partir de diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). a porção interna com centros de origem (setas) em calo induzido em sacarose com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 20 dias. b detalhe de um centro de origem com células meristemáticas, com protoplasto denso (setas) e elementos traqueias diferenciados (pontas de seta), calo em glucose com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 20 dias. c elementos traqueais em secção longitudinal (setas), calo em sacarose com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias. d núcleos conspícuos (nu) e vacúolos (v) em células entorno do tecido provascular de calo induzido em frutose com 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias. e núcleo conspícuo (nu),

mitocôndrias (pontas de seta) e corpos eletrodensos (setas) em célula de calo induzido em frutose com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias. f mitocôndrias (pontas de seta) e golgi (seta) em célula de calo produzido em frutose 1,25 de ANA, 40 dias. g amiloplastos (pontas de seta) em célula de calos induzido em sacarose com 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 40 dias. Barras: a=100 $\mu\text{m}$ ; b,c=10 $\mu\text{m}$ ; d,e=2 $\mu\text{m}$ , f-0,5 $\mu\text{m}$ ; g=5 $\mu\text{m}$

As maiores concentrações de fenólicos totais foram verificadas em calos de *P. tenuifila* produzidos em meio de cultura suplementado com frutose nas concentrações de 1, 25  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA (Tab. 2.2). Calos induzidos nesta mesma fonte de carbono também apresentaram o maior conteúdo de flavonóides entre os tratamentos quando utilizada a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA no meio de cultura. Calos produzidos em frutose com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram o maior conteúdo de amido entre os tratamentos (Tab 2.2). Os maiores níveis de açúcares solúveis totais foram verificados em calos produzidos em meio de cultura suplementado com frutose e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA.

Os calos não apresentaram atividade antioxidante, ou seja, não houve redução do DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil). Clorofilas *a* e *b* também não foram detectadas sendo que os valores de absorvância, nestas análises, ficaram no limite de detecção do espectrofotômetro e, quando calculados, resultaram em zero, tanto em concentrações por massa fresca quanto em concentrações por massa seca. Análises de carotenóides por CLAE possibilitaram identificar e quantificar luteína, zeaxantinas e  $\alpha$ -caroteno nos calos. O maior nível de luteína e zeaxantinas foram detectados em calos produzidos em glucose com 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA (Tab. 2.3). Neste mesmo tratamento e, no tratamento com frutose e 5,0  $\mu\text{m}$  de ANA e sacarose com 1,25  $\mu\text{m}$  de ANA, foram verificadas as maiores concentração de  $\alpha$ -caroteno entre as amostras analisadas (Tab. 2.3).

**Tab.2. 2** Conteúdos de açúcares totais, amido, fenólicos totais e flavonóides em calos de *P. tenuifila* iniciados a partir de segmentos caulinares cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose, glucose ou frutose e diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA).

Fonte de Carbono (88,5 mM)	ANA ( $\mu$ M)	Fenólicos totais <sup>y</sup> (mg EAG/g MS)	Flavonóides <sup>y</sup> (mg quercetina/g MS)	Amido <sup>z</sup> (galactose mg/g MS)	Açúcares totais <sup>z</sup> (glucose mg/g MS)
Sacarose	1,25	0,57 $\pm$ 0,04 c	0,16 $\pm$ 0,03 cd	1,83 $\pm$ 0,09 bc	22,50 $\pm$ 0,44 ab
	2,5	0,51 $\pm$ 0,05 cd	0,29 $\pm$ 0,04 b	2,04 $\pm$ 0,06 ab	17,60 $\pm$ 0,43 c
	5,0	0,40 $\pm$ 0,04 de	0,30 $\pm$ 0,05 b	1,76 $\pm$ 0,09 c	20,87 $\pm$ 0,56 b
Glucose	1,25	0,57 $\pm$ 0,05 c	0,18 $\pm$ 0,05 c	0,94 $\pm$ 0,07 e	12,10 $\pm$ 1,23 d
	2,5	0,83 $\pm$ 0,07 b	0,01 $\pm$ 0,02 e	0,58 $\pm$ 0,09 f	8,68 $\pm$ 1,19 e
	5,0	0,29 $\pm$ 0,11 e	Ausente	1,41 $\pm$ 0,10 d	22,31 $\pm$ 1,30 ab
Frutose	1,25	1,03 $\pm$ 0,07 a	0,08 $\pm$ 0,04 de	2,13 $\pm$ 0,16 a	10,77 $\pm$ 1,05 de
	2,5	0,71 $\pm$ 0,08 b	0,40 $\pm$ 0,12 a	0,95 $\pm$ 0,11 e	9,69 $\pm$ 1,07 e
	5,0	1,03 $\pm$ 0,07 a	Ausente	0,82 $\pm$ 0,10 ef	23,26 $\pm$ 0,56 a

<sup>y</sup> Médias de três leituras, <sup>z</sup> Médias de quatro leituras seguidas de desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com os testes T-student ou Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS=massa seca, EAG=equivalentes em ácido gálico.

**Tab.2. 3** Concentração dos carotenóides (mg/g MS) determinados por CLAE para extratos organossolventes (hexano:acetona:BHT) de calos de *P. tenuifila* produzidos a partir de segmentos caulinares jovens em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA)

Fonte de Carbono (mM)	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Luteína <sup>y</sup> Rt (min) = 3,3	Zeaxantina total <sup>y</sup> Rt (min) = 3,8	$\alpha$ - caroteno <sup>y</sup> Rt (min) = 10,1
Sacarose	1,25	1,79 $\pm$ 0,01 d	1,29 $\pm$ 0,04 f	Ausente
	2,5	2,18 $\pm$ 0,13 bc	0,58 $\pm$ 0,07 g	Ausente
	5	1,46 $\pm$ 0,07 e	1,28 $\pm$ 0,08 f	Ausente
Glucose	1,25	2,29 $\pm$ 0,13 b	2,58 $\pm$ 0,11 d	Ausente
	2,5	4,54 $\pm$ 0,08 a	8,96 $\pm$ 0,15 a	4,33 $\pm$ 0,26 a
	5	2,08 $\pm$ 0,13 c	4,92 $\pm$ 0,19 c	3,58 $\pm$ 0,28 b
Frutose	1,25	1,49 $\pm$ 0,18 e	2,09 $\pm$ 0,03 e	Ausente
	2,5	1,87 $\pm$ 0,17 d	1,87 $\pm$ 0,12 e	Ausente
	5	1,17 $\pm$ 0,11 f	6,53 $\pm$ 0,02 b	4,96 $\pm$ 0,21 a

<sup>y</sup> Médias de três injeções (10  $\mu\text{L}$ ) seguidas de desvio padrão  $\pm$ , letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS=massa seca. Rt=tempo de retenção

## 2.4 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a utilização de segmento caulinar como explante e a suplementação do meio de cultura com ANA, nas concentrações usadas (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ ), foram eficientes para a indução de calos em *P. tenuifila*. Entre as fontes de carbono utilizadas, a sacarose promoveu o maior acúmulo de biomassa seca nos calos, embora os calos tenham apresentado aspecto menos volumoso que aqueles formados com glucose e frutose.

As características histológicas dos calos friáveis de *P. tenuifila* indicam que as culturas estavam no primeiro estágio para a produção de metabólitos secundários a partir da cultura de tecidos *in vitro* considerado por Murphy *et al.* (2014), onde observa-se o crescimento e multiplicação celular para o acúmulo de biomassa. A presença de algumas células com protoplasto rico em mitocôndrias também indicam a plena atividade celular nos calos, tendo em vista que as mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia (ATP) para todas as atividades celulares (Gunning & Steer, 1996). Além de mitocôndrias, registrou-se em todos os tratamentos a presença de amido e açúcares na constituição dos calos. Estes constituintes são importantes fontes de reserva energética para o processo de crescimento e manutenção da planta, participando do metabolismo primário (Taiz, Zeiger, 2004). É importante considerar que amido e açúcares solúveis totais são as fontes de esqueletos de carbono disponíveis para a biossíntese das moléculas dos metabólitos secundários.

Os calos estudados apresentaram características similares às observadas por Konieczny *et al.* (2007) em calos de trigo, onde a região interna mostrou-se ocupada por tecido meristemático de aparência compacta e a região periférica, constituída por células frouxamente unidas. Nos centros de origem dos calos de *P. tenuifila*, houve a diferenciação de células em elementos traqueais para servirem de condutoras de nutrientes para as células periféricas. Rocha *et al.* (2012), em estudo sobre a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora cincinnata*, concluíram que a

presença de tecidos vasculares é importante para auxiliar na formação de áreas pró-embriogênicas.

A concentração de clorofilas *a* e *b* nas amostras, independente do tratamento, mostrou-se inexpressiva, fato que pode ser explicado pela rara presença de cloroplastos nas análises ultraestruturais dos calos de *P. tenuifila*. George *et al.* (2008b) explica que calos expostos à luz contínua podem apresentar regiões verdes, a partir das quais verificam-se o surgimento de novos brotos, assim, as regiões verdes com células contendo cloroplastos, são associadas com a capacidade do calo de se submeter à morfogênese (George *et al.*, 2008b). Além disso, George *et al.* (2008b) salienta que a agregação celular favorece a formação e contínua integridade do cloroplastos. Esta abordagem explica a carência de cloroplastos nos calos friáveis de *P. tenuifila* pois, não foram verificadas regiões verdes com surgimento de brotos e/ ou agregados celulares.

Os calos de *P. tenuifila* apresentaram compostos fenólicos, flavonóides e importantes carotenóides (luteína, zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno) evidenciando seu potencial para futuros estudos sobre a produção de metabólitos secundários *in vitro*. No organismo humano, os carotenóides têm importante papel nutricional porque muitos deles, como o  $\alpha$ -caroteno, converterem-se em vitamina A e/ ou atuam como antioxidantes (Araújo, 2008, Pereira & Cardoso, 2012). A luteína e a zeaxantina não são precursores da vitamina A, no entanto, são importantes na degeneração macular associada à idade e são excelentes antioxidantes lipossolúveis que bloqueiam radicais livres no organismo humano (Stahl & Sies, 2003).

A presença de compostos fenólicos demonstra que os fatores necessários para garantir as atividades das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e tirosina amônio liase (TAL) estiveram presentes, especialmente quando a fonte de carbono utilizada foi a frutose. Contudo, nessas condições de cultura, os valores de açúcares solúveis totais e amido não foram os maiores, exceto o nível de açúcares solúveis totais em frutose e 5  $\mu$ M de ANA. Tais resultados indicam variações na regulação da biossíntese de fenólicos totais e flavonóides nos calos de *P. tenuifila*, dependendo da fonte de carbono utilizada e da concentração de ANA.

Poucos são os estudos disponíveis que quantificam a produção de metabólitos secundários em calos ou suspensões celulares de espécies de *Passifloras*, no entanto, de acordo com Ramakrishna & Ravishankar (2001) a elicitação tem sido amplamente utilizada para aumentar a produção ou para induzir a síntese de novos metabólitos secundários em culturas de células, órgão ou tecidos vegetais. Elicitor é o nome dado à condição de estresse imposta ao cultivo *in vitro* (Dornenburg & Knorr, 1995) como alterações de temperatura, salinidade, radiação UV, entre outros (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). Em trabalho publicado recentemente, Lugato *et al.* (2014) detectou em calos friáveis de *Passiflora alata* Curtis a concentração de compostos fenólicos de 5,97 mg EAG/ g de massa seca, valor aproximadamente seis vezes maior do que os determinados no presente trabalho para os calos crescidos em frutose (1,03 mg EAG/g de massa seca). No entanto, Lugato *et al.* (2014) manteve as culturas de calos de *P. alata* em sala de crescimento com o dobro da intensidade luminosa ( $46 \mu\text{mol.m}^{-2}, \text{s}^{-1}$ ) utilizada no presente estudo ( $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}, \text{s}^{-1}$ ).

Antognoni *et al.* (2007) testaram o metil jasmonato e a irradiação UV-B como elicitores para aumentar a produção de metabólitos em calos de *P. quadrangularis*. Sem a adição de elicitores encontraram apenas pequenas quantidades de isoorientina nos calos, enquanto que a concentração de outros flavonóides foi inferior ao limite de detecção do aparelho (Antognoni *et al.*, 2007). No entanto, após 7 dias de irradiação UV-B, a produção de isoorientina atingiu concentrações semelhantes às aquelas encontradas em folhas frescas de plantas adultas e a elicitação com metil jasmonato também aumentou as concentrações de orientina, vitexina e isovitexina, embora a estimulação tenha sido mais fraca do que a exercida por tratamento com UV-B (Antognoni *et al.*, 2007). Os autores observaram também que a atividade antioxidante aumentou de 28% para 76% em calos tratados com UV-B (Antognoni *et al.*, 2007).

Ali & Abbasi (2014) testaram diferentes concentrações de TDZ (tidiazuron) com ou sem ANA (ácido naftaleno acético) para a elicitação de culturas de *Artemisia absinthium* e obtiveram nível máximo de teor de fenólicos totais (8,53 mg EAG/g MF) e de atividade antioxidante (72,6%) em calos formados em resposta a



1,0 mg/l de TDZ com 42 dias de cultivo *in vitro*. Vários outros trabalhos também demonstram o potencial da eliciação para promover o aumento na produção de compostos secundários (Dong *et al.*, 2010; Palacio *et al.* 2011; Lim *et al.*, 2013). Assim, sugerimos que estudos futuros também poderiam ser desenvolvidos utilizando elicitores visando o aumento das concentrações de fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides em calos de *P. tenuifila*.

A ausência de atividade antioxidante nos calos de *P. tenuifila* analisados pode ser um indicativo de que as concentrações de compostos fenólicos totais e flavonóides totais encontradas foram baixas. Vários trabalhos têm mostrado que a atividade antioxidante está relacionada com a presença de metabólitos secundários. Jayasinghe *et al.* (2003), em pesquisa com *Ocimum basilicum* (manjeriço doce) constataram que quanto maior o conteúdo de fenólicos totais nas amostras, maior era a percentagem de inibição do DPPH, resultando em maior atividade antioxidante. Ali *et al.* (2013), em estudo com culturas de células em suspensão de *Artemisia absinthium*, observaram que a atividade antioxidante têm correlação positiva com a produção de metabólitos secundários durante o crescimento da cultura. Complementam dizendo que isso ocorre porque a percentagem de inibição de DPPH e o máximo acúmulo de compostos fenólicos totais e flavonóides totais foram registrados em calos com 35 dias de idade. Posteriormente, estes autores verificaram um declínio da atividade antioxidante, enquanto a concentração de metabólitos secundários também diminuía.

Palacio *et al.* (2012), em estudo com calos de *Larrea divaricata* em diferentes níveis de diferenciação, verificaram que a capacidade de tecidos indiferenciados de formar compostos fenólicos foi limitada, contudo, quando os calos sofreram organogênese, desenvolvendo principalmente ramos adventícios, a produção de compostos fenólicos aumentou significativamente. Conforme as análises histológicas do presente estudo, calos de *P. tenuifila* com 45 dias de cultivo não apresentaram tecidos diferenciados, apenas elementos traqueais nos centros de origem. Assim, é possível que calos de *P. tenuifila* com mais tempo de cultivo *in vitro* produzissem maiores teores de compostos secundários. Enfatiza-se, ainda, que nem sempre os calos produzidos são homogêneos, podendo, assim, ocorrer regiões com maior concentração de compostos do que outras.

Por isso, sugerimos que seja sempre procedida a homogeneização da massa calogênica, a qual deve ser realizada logo após a coleta dos calos na sala de crescimento, ou anterior à maceração para a extração de compostos, pois a observação ou não destes critérios pode influenciar a discrepâncias entre resultados.

Através das características histológicas e das extrações e dosagens de metabólitos foi possível concluir que os calos de *P. tenuifila* com 45 dias de cultivo *in vitro* apresentam grande potencial para a produção de metabólitos secundários desde que sejam aplicadas técnicas para elicitação das culturas. Manter as culturas durante mais tempo *in vitro* também pode contribuir para o aumento das concentrações de metabólitos tendo em vista que isso favorece a diferenciação celular. Os calos friáveis obtidos também são importantes para utilização em culturas de células em suspensão. O estudo histológico dos calos permitiu comparar características das células com os resultados de extração de compostos, mostrando-se uma ferramenta viável para a comparação das culturas submetidas a diferentes tratamentos.

## 2.5 REFERÊNCIAS

Akhondzadeh S, Kashani L, Mobaseri M, Hosseini H, Nikzad S, Khani M (2001). Passion flower in the treatment of opiates withdrawal: a double-blind randomized controlled trial. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** **26**: 369 - 373

Ali M, Abbasi BH, Ihsan-ul-haq (2013). Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products** **49**: 400-406

Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangulares* callus cultures. **Fitoterapia** **78**: 345-352

Arnon DI (1949). Copper enzyme in isolated chloroplast. **Plant Physiology** **24**: 1-15

Araújo, J. M. (2008). Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4ed. Viçosa: Editora UFV, 477p

Bernacci LC, Cervi AC, Milward-de-Azevedo MA, Nunes TS, Imig DC, Mezzonato AC (2015). *Passifloraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>). Accessed 02 jan 2015

Braga MF, Batista AD, Junqueira NTV, Junqueira KP, Santos ECS, Santos FC (2005). Características agrônômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) cultivado no Distrito Federal. *In*: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, Pinto ACQ, Sousa ES. IV Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro. Planaltina: Embrapa Cerrados, p 230

Costa AM, Tupinambá DD (2005). O maracujá e suas propriedades medicinais: estado da arte. *In*: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF(Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p 475-506

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004). Passiflora: a review update. **J Ethnopharmacol** **94**: 1–23

Dong J, Wan G Lian Z (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. **Journal of Biotechnology** **148**: 99-104

Dornenburg H, Knorr D (1995). Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enz Microb Technol** **17**: 674-684

Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) (2011). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 36 p

Fiebich BL, Knörle R, Appel K, Kammler T, Weiss G (2011). Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): *in vitro* and *in vivo* evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia** **82**: 474-480

Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular and Development Biology Plant** **32**: 272-289

George EF, Debergh PC (2008a). Adventitious Regeneration. *In*: George EF, Hall MA, Klerk GJ (Ed). **Plant propagation by tissue culture**, 3ed, Dordrecht: Springer, p.355-396

George EF, Debergh PC (2008b). Plant Tissue Culture Procedure: Background. *In*: George EF, Hall MA, Klerk GJ (Ed). **Plant propagation by tissue culture**, 3ed, Dordrecht: Springer, p.1-28

Gerrits & Smid (1983). A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Jornal of Microscopy** **132**: 81-85

Gunning BES, Steer MW (1996). **Plant Cell Biology: Structure and Function**. Boston: Jones and Bartlett Publishers

Hiscox JD, Israelstam, GF (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany 57**: 1332-1334

Ingale AG, Hivrale AU (2010). Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science 4**: 417-426

Jayasinghe C, Jayasinghe C, Goto N, Aoki T, Wada S (2003). Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry 51**: 4442-4449

Kim DO, Jeong SW, Leecy CY (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, **Food Chemistry 81**: 231-326

Konieczny R, Swierczynska J, Czaplicki AZ, Bohdanowicz J (2007). Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat. **Plant Cell Tissue Org Cult 26**: 355-36

Kuhnen S, Lemos PMM, Campestrini LH, Ogliari JB, Dias PF, Maraschin M (2010). Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture 91**: 1548-1553

Laudano WS (2005). Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Lim FL, Yam MF, Asmawi MZ, Chan L (2013). Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products 50**: 436-442

Lugato D, Simão MJ, Garcia R, Mansur E, Pacheco G (2014). Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vitro* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **118**: 339-346

Maciel SA, Fermino-Junior PCP, Silva RA, Scherwinski-Pereira JE (2010). Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum. Agronomy** **32**: 263-267

McCready RM, Guggolz J, Silveira V, Owens HS (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry** **22**: 1156-1158

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497

Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **118**: 1-16

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964). Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma** **59**: 368-373

Ozarowski M, Thiem B (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **23**: 937-947

Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica** **20**: 257-264.

Palacio L, Cantero JJ, Cusidó R, Goleniowski M (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science** **193-194**: 1-7

- Palacio L, Cantero JJ, Cusidó R, Goleniowski M (2011). Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. plant cell cultures and effect of precursor feeding. **Process Biochemistry** **46**: 418-422
- Patel SS, Soni H, Mishra K, Singhai AK (2011). Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology** **1**: 1-16
- Pereira RJ, Cardoso MG (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity** **3**: 146-152
- Petry RD, Reginatto F, de-Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, Kapczynski F, Ortega GG, Schenkek EP (2001). Comparative pharmacological study of hidroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytother Res** **15**: 162-164
- Reynolds ES (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** **17**: 208-212 [Dept. Anatomy, Harvard Medical School, Boston, MA]
- Rocha, DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012b). Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma** **249**: 747-758
- Ruzin SE (1999). **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford: Oxford University Press
- Santos FC, Ramos JD, Pasqual M, Rezende JC, Santos FC, Villa F (2010). Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres** **57**: 112-117
- Santos FC, Ramos JD, Pasqual M, Rezende JC, Santos FC, Villa F (2010). Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres** **57**: 112-117
- Shanon JC (1968). A procedure for extraction and fractionation of Carbohydrates from immature *Zea mays* Kernels. Res. Bul. p 1-8

Silva FAS, Azevedo CAV (2009). Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. *In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers*

Spurr AR (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43

Stahl W, Sies H (2003). Antioxidant activity of carotenoids: Molecular Aspects of Medicine. v. 24, p. 345–351, 2003

Taiz L, Zeiger E (2004). **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Editora Artmed, 3 ed

Umbreit WW, Burris RH (1964). **Method for glucose determination and other sugars**. Manometric techniques, Burgess Publishing Co, Red Lion, PA, USA

Zacarias AA, Moresco HH, Horst, H, Brighente IMC, Marques MCA, Pizzollati MG (2007). Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. *In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul*

Zeraik ML, Pereira CAM, Zuin VG, Yariwake JH (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: 459-471



### 3. CAPÍTULO III

## ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR NA FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS EM *PASSIFLORA* L.

### RESUMO

A matriz extracelular (ME), presente em materiais resultantes da cultura de tecidos *in vitro* de várias espécies, têm sido relacionada à funções importantes que influenciam nos processos de cultivo *in vitro*, como na embriogênese somática ou na organogênese, sendo mencionada como um marcador estrutural. A ME também está presente em calos friáveis de *P. tenuifila* e *P. setacea*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a ME e como ela determina a desintegração das células nos calos friáveis de espécies de *Passiflora*. Para o estudo foram usados calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, obtidos por indução em diferentes tipos de explantes e meios de cultivo *in vitro*. Amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, desidratadas, infiltradas em hidroxietilmetacrilato, seccionadas em micrótomo, coradas com azul de toluidina ou submetidas à reação com vermelho de rutênio, para identificar natureza química, e analisadas em Microscopia Óptica (MO). Algumas amostras foram secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub>, para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Outras amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, desidratadas, infiltradas em resina Spurr, seccionadas em ultramicrótomo, contrastadas com Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo e analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os calos de *Passiflora* analisados, independente do tipo de explante ou condições de cultivo, mostraram-se friáveis, com região central compacta e células periféricas tendendo ao isolamento. Foi identificada a constituição péctica da ME. A superfície dos calos estava revestida com ME membranosa, com aspecto liso externamente e granular ou fibrilar internamente. Resultados indicam que o aspecto granular ou fibrilar decorre da desconexão entre células. Presença de golgi, vesículas na periferia da célula e evidências da liberação de substâncias (sentido: vesículas, parede celular e espaço intercelular) e dissociação intercelular foram registradas

ultraestruturalmente. As evidências estruturais sugerem que a consistência friável dos calos de *Passiflora* é resultante da desconexão das células periféricas dos calos, que resulta da alteração na ME. Este processo ocorreu nos calos de ambas as espécies de *Passiflora* analisadas, independentemente do tipo de explante que gerou o calo ou do meio de cultura utilizado.

**Palavras-Chave:** Matriz extracelular, calos friáveis, ultraestrutura, substâncias pécicas

## ABSTRACT

The extracellular matrix (EM), surrounding materials resulting from *in vitro* tissue culture of several species, has been related to the important functions that influence the *in vitro* culture processes, such as somatic embryogenesis or organogenesis and is mentioned as a structural marker. The EM is also present in friable callus of *P. tenuifila* and *P. setacea*. The objective of this study was to characterize, based on ultrastructure, how the ME determines the disintegration of cells in friable callus of *Passiflora* species. For the study was used *P. tenuifila* and *P. setacea* callus obtained by induction in different explants and *in vitro* culture methods. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2, dehydrated, infiltrated in methacrylate, sectioned with a microtome, stained with toluidine blue or subjected to reaction with ruthenium red to identify the nature chemistry, and analyzed in optical microscopy (OM). Some samples were dried in critical point of CO<sub>2</sub>, for analysis in scanning electron microscopy (SEM). Other samples was post-fixed in osmium tetroxide, infiltrated in Spurr resin, sectioned with ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and analyzed in transmission electron microscopy (TEM). The *Passiflora* callus analyzed, regardless of the explant or culture conditions, were friable, with compact central and peripheral cells tending to isolation. The pectin formation of ME was identified. The surface of the callus was coated with EM membranous, with smooth appearance externally and granular or fibrillar internally. Results indicate that granular or fibrillar aspect stems from the disconnect between cells. Presence of Golgi, vesicles at the periphery of the cell and evidence of the release of substances (meaning: vesicles, cell wall and intercellular space) and intercellular dissociation ultrastructure were recorded. Structural evidence suggests that friable callus of *Passiflora* results from the disconnection of peripheral cells of callus which results from the change in the EM. This process occurred in both callus *Passiflora* species analyzed, regardless of the type of explant generating callus or culture medium.

**Key words:** Extracellular matrix, friable callus, ultrastructure, pectic substances

### 3.1 INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (ME) é uma fina camada externa à parede celular e está presente durante os processos de embriogênese somática (Blehová *et al.*, 2010). A ME foi citada pela primeira vez por Sondhal *et al.* (1979) ao observares que estava presente na superfície de células proembrióides de *Coffea*. Desde então, vários pesquisadores têm concentrado atenção na ME de culturas *in vitro* de diversas espécies de plantas, tais como em *Drosera rotundifolia* e *Zea mayz* (Samaj *et al.*, 1995), *Cocos nucifera* (Verdeil *et al.*, 2001), *Fagopyrum tataricum* (Rumyantseva *et al.* 2003), *Triticum aestivum* (Konieczny *et al.*, 2005; Pilarska *et al.*, 2007), *Drosera spathulata* (Blehová *et al.*, 2010), *Actinidia deliciosa* (Popielarska-Konieczna *et al.*, 2010), *Vitis vinifera* (Pereira *et al.*, 2011), *Trifolium nigrescens* (Pilarska *et al.*, 2013), *Helianthus tuberosus* (Pilarska *et al.*, 2014), *Oryza sativa* (Bevitore *et al.*, 2014) entre outras. Estas investigações decorrem do fato de que a ME tem sido relacionada à recepção de sinais e transdução, auxiliando no reconhecimento e determinação do destino da célula (Popielarska-Konieczna *et al.*, 2010), à detecção de condições ambientais (Chapman *et al.*, 2000) e à aquisição de competência embriogênica (Verdeil *et al.*, 2001; Yusoff *et al.*, 2012). Bobák *et al.* (2003/4) ressaltaram também o importante papel da ME na interação célula-célula, na divisão celular, na diferenciação e na regeneração e manutenção de algumas características de um agrupamento de células vegetais. A ME também é mencionada como um marcador estrutural na embriogênese somática (Samaj *et al.*, 1999, Chapman *et al.*, 2000) ou na organogênese (Popielarska-Konieczna *et al.*, 2008).

Assim, a ultraestrutura da ME tem sido abordada com enfoque na competência embriogênica. Chapman *et al.* (2000) verificaram que a aparência fibrilar da ME está associada a um estágio intermediário da embriogênese somática em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Popielarska-Konieczna *et al.* (2008) observaram ME com estrutura externa membranosa e compacta, mas também perceberam regiões com estrutura fibrilar entre células. Posteriormente, foi questionado por alguns pesquisadores que a variação na ultraestrutura da ME seria decorrente dos procedimentos de preparo das amostras. Popielarska-Konieczna *et al.* (2010) registraram ME fibrilar e

granular, além da ME membranosa, utilizando técnicas e equipamentos que descartassem a ocorrência de artefatos.

A constituição da ME também tem sido investigada. Através do tratamento com proteases, Samaj *et al.* (1995) identificaram proteínas na superfície da ME. Verdeil *et al.* (2001), utilizando anticorpos monoclonais em calos de côco, identificaram a pectina como outro componente. Pectinas são polissacarídeos ácidos altamente complexos, abundantes na parede celular e secreções dos vegetais (Konieczny *et al.*, 2007). Fragmentos de pectina também podem funcionar como moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação de processos de desenvolvimento (Dumville & Fry, 2000). Componentes da parede celular das células vegetais como proteínas arabinogalactânicas, pectinas e outros, desempenham um papel crucial durante a embriogênese somática e zigótica em plantas (Samaj *et al.*, 2005). Estes componentes auxiliam na divisão e expansão celular antes da embriogênese e após a diferenciação do embrião (Samaj *et al.*, 2005). Pesquisas suportam a idéia de que não somente a célula pode afetar sua parede, mas a parede, por sua vez, pode influenciar o comportamento das células (Blehova *et al.*, 2010).

O processo de desintegração da estrutura do tecido tem um papel relevante na separação de células embriogênicas individuais (Rumyantseva *et al.*, 2003). George (2008) ressalta que o tecido do calo não é de um tipo único, diferindo no grau de compactação e potencial morfogenético. O autor acrescenta que perda de compactação, calo friável, é o tipo geralmente selecionado para iniciar culturas em suspensão. Mas, que eventos ultraestruturais ocorrem para transformar um conjunto de células compactas em friáveis?

O objetivo deste estudo foi caracterizar a matriz extracelular, com base na ultraestrutura, e como ela determina a desintegração das células dos calos friáveis de duas espécies de *Passiflora*, *P. tenuifila* e *P. setacea*.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 MATERIAL VEGETAL**

Foram utilizados calos de *P. tenuifila* coletados com 40 dias de cultivo *in vitro* e calos de *P. setacea* com 60 dias de

cultivo *in vitro*. Os calos de *P. tenuifila* foram produzidos utilizando-se como explantes segmentos caulinares, os quais foram obtidos de ramos com 135 dias, resultantes do alongamento *in vitro* de ápices caulinares coletados de plantas com 60 dias de idade, cultivadas em casa de vegetação. Os calos de *P. setacea* foram produzidos a partir de explantes de raiz, hipocótilo e cotilédone, os quais foram excisados de plantas axênicas com 60 dias de idade, obtidas a partir da germinação de sementes inoculadas *in vitro*.

### 3.2.1 PRODUÇÃO DE CALOS DE *P. TENUIFILA*

#### 3.2.1.1 Obtenção de explantes

Ápices caulinares de *P. tenuifila* foram coletados de plantas com 60 dias de idade, cultivadas em casa de vegetação. Os ápices foram lavados com água da torneira e detergente neutro, enxaguados (4x) e, em fluxo laminar, foram imersos por 1 min e 30 seg em álcool 70%, lavados (3x) em água destilada esterilizada, imersos por 2 min e 30 seg em solução comercial de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, com algumas gotas de detergente. Em seguida, foram enxaguados (4x) com água destilada esterilizada e inoculados em meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), 0,2% (m/V) de Phytigel e com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  utilizando-se HCl (1N) e NaOH (1N), seguindo-se com a esterilização, por 18 min, a  $121^{\circ}\text{C}$  e  $1,1 \text{ Kg/cm}^3$ . Após a inoculação, os tubos de ensaio foram selados com filme de polipropileno e mantidos em sala de crescimento com condições controladas. Após 135 dias, os segmentos caulinares dos ramos resultantes do alongamento *in vitro* dos ápices caulinares, foram utilizados como explantes para a indução de calos.

#### 3.2.1.2 Indução de calos de *P. tenuifila* a partir de segmentos caulinares

Segmentos caulinares, com cerca de 1 cm de comprimento, foram excisados dos ramos resultantes do alongamento de ápices caulinares. Em seguida, foram inoculados em meio de Murashige e Skoog (1962) com 0,2% (m/V) de Phytigel foi suplementado com três diferentes fontes de

carbono – 88,5 mM de sacarose (Sac), 88,5 mM de frutose (Fru) e 88,5 mM de glucose (Glu) – e para cada fonte de carbono foram usadas três diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) – 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ . O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , utilizando-se HCl (1N) e NaOH (1N), e esterilizado, por 18 min, a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,1 \text{ Kgf.cm}^3$ . Após a inoculação, os tubos de ensaio foram selados com filme de polipropileno e mantidos em sala de crescimento com condições controladas por 40 dias.

### 3.2.2 PRODUÇÃO DE CALOS DE *P. SETACEA*

#### 3.2.2.1 Germinação de sementes e estabelecimento de plantas axênicas

Sementes de *P.setacea* foram recebidas do banco de germoplasma de Passifloras da Embrapa Cerrados. As sementes foram lavadas com água e detergente neutro, enxaguadas (4x), desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (v/v) por 10 min e lavadas (4x) com água destilada esterilizada. Posteriormente foram inoculadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH foi ajustado para  $5,8 (\pm 0,1)$  utilizando HCl (1N) e NaOH (1N). O meio de cultura foi esterilizado por 18 min a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,1 \text{ Kgf/cm}^3$ . Após a inoculação, os tubos de ensaio foram selados com filme de polipropileno e mantidos em sala de crescimento com condições controladas obtendo-se plantas axênicas após 60 dias.

#### 3.2.2.2 Indução de calos de *P. setacea* a partir de explantes de raiz, hipocótilo e cotilédone

Explantes de raiz, de hipocótilo e de cotilédone foram excisados de plantas axênicas de *P. setacea* com 60 dias de idade e inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) suplementado com 59 mM de sacarose, 0,2% (m/V) de Phytigel e concentração de 5  $\mu\text{M}$  de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Após a inoculação, os tubos de ensaio foram selados com filme de polipropileno e mantidos em sala de crescimento com condições controladas por 60 dias.

### 3.2.3 CONDIÇÕES DE CULTURA

Todas as culturas de *P. setacea* e *P. tenuifila* (ápices caulinares, sementes e calos) foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de  $22,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  provida por lâmpadas fluorescentes Philips TDL e umidade relativa de 70%.

### 3.2.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ESTUDOS HISTOLÓGICOS

#### 3.2.4.1 Microscopia Óptica (MO)

Amostras dos calos foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica (Gerrits & Smid, 1983). Para microscopia de luz as amostras foram infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Secções com  $3\mu\text{m}$  foram obtidas em micrótomo rotativo RM 2125 RT (Leica, Nussloch, Alemanha) e distendidas sobre lâminas contendo água sob chapa aquecedora ( $42^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964) para caracterização histológica. Para identificar substâncias pécticas foi utilizado o vermelho de rutênio (Gerlach, 1984). Para identificar substâncias pécticas foi utilizado o vermelho de rutênio (Gerlach, 1984). Lâminas permanentes foram confeccionadas com verniz vitral incolor 500® (Paiva *et al.* 2006). As imagens foram capturadas através de Microscópio DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça).

#### 3.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras dos calos foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica (Gerrits & Smid, 1983). Após, foram submetidas à secagem em ponto crítico de  $\text{CO}_2$  Leica® EM-CDP-030 (Heidelberg, Germany), conforme



metodologia de Horridge & Tamm (1969), e recobertas com 20 nm de ouro paládio em metalizador EM SCD (Leica, Viena, Áustria). As imagens foram capturadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol XL30 (Tokyo, Japão), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

### 3.2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio, na mesma solução tampão, seguindo com a desidratação gradual em acetona até 100%. Posteriormente, foram infiltradas em resina Spurr (Spurr, 1969). O material foi seccionado em ultramicrotomo com 50 nm de espessura, alocado sobre grades de cobre econtrastado com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). O material foi observado e documentado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca Jeol, modelo JEM-1011(Tokio, Japão), no LCME-UFSC.

## 3.3 RESULTADOS

Os calos formados nas duas espécies de *Passiflora* analisados, *P. tenuifila* e *P. setacea*, independente do tipo de explante ou condições do meio de cultura, apresentaram-se friáveis, com uma região mais central compacta e a periférica com células tendendo ao isolamento. A superfície dos calos, vista em microscopia eletrônica de varredura, mostrou-se revestida por matriz extracelular membranosa (MEM; Fig. 3.1a-c). A MEM apresenta aspecto liso quando envolve externamente as células, principalmente no caso de células curtas (Fig. 3.1d), pois com o alongamento das células periféricas (Fig. 3.1b,c) ocorre o rompimento desta MEM (Fig. 3.1a-d). Em regiões onde a ME desconectou-se das células, foi possível visualizar que internamente a ME é constituída por material que fica depositado em forma de grânulos (MEG) na superfície e entre as células (Fig. 3.1d,f,g). Algumas vezes também observou-se a forma fibrilar (MEF) deste material resultante da desconexão entre células (Fig. 3.1e).

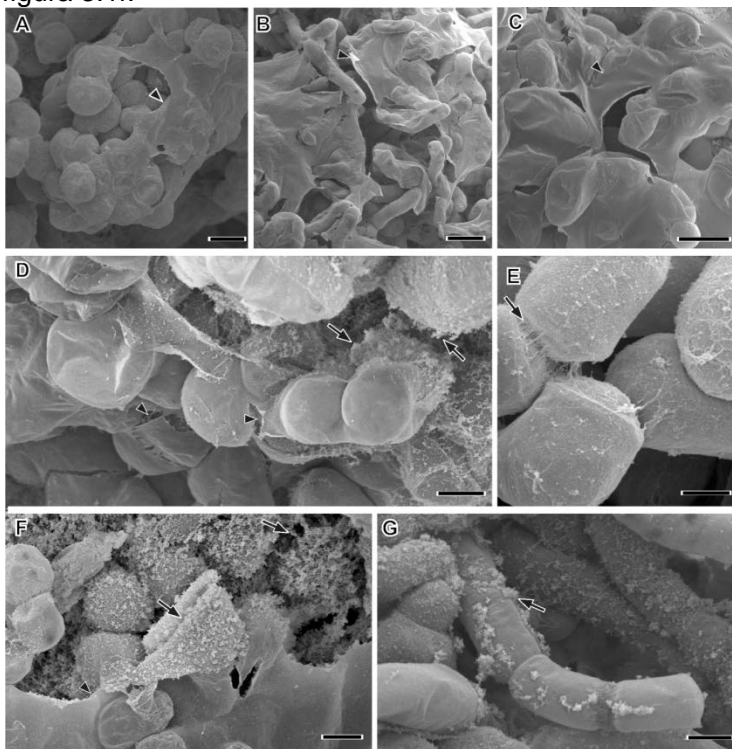
Secções transversais dos calos revelaram que as células mais internas mantêm-se justapostas, enquanto as mais

periféricas desprendem-se (Fig. 3.2a,b). Células com paredes justapostas retas, indicando recente divisão celular (Fig. 3.2c) estavam unidas por reduzido material intercelular. Entretanto, a face convexa destas mesmas células distanciava-se de outras pela conspícua deposição de substâncias constituindo a ME (Fig. 3.2c-e). Este material reagiu positivamente ao vermelho de rutênio (Fig. 3.2c), confirmando a constituição por substâncias pécticas. Registrou-se ainda que a ME, algumas vezes mantinha-se contínua periféricamente, embora radialmente as células já estivessem desconectadas e com aspecto granular, tanto na face interna da ME periférica, quanto nas paredes das células desconectadas (Fig. 3.2a).

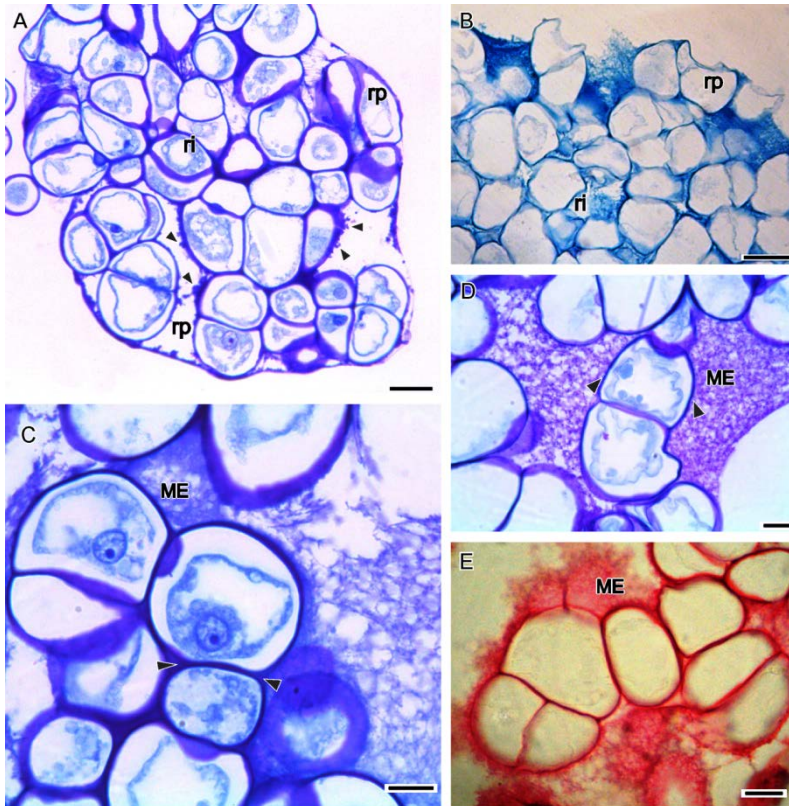
Ultraestruturalmente, as células da região mais interna dos calos apresentaram vacúolos conspícuos, algumas vezes com indícios de fusão entre vacúolos menores (Fig. 3.3a). Nestas células o protoplasto ocupava grande proporção da célula, sendo rico em retículo endoplasmático e grânulos de amido (Fig. 3.3b). Os espaços intercelulares mostraram-se preenchidos por substância granular osmiofílica (Fig. 3.3a). Na Fig. 3.3b (seta) pode ser observado que a lamela média é delgada entre duas células e dilata-se separando as duas células (para cima na figura), decorrente de maior deposição de substâncias pécticas.

As células mais periféricas dos calos exibiram amplos vacúolos (Fig. 3.3c), ficando o protoplasto pressionado na periferia da célula, sendo rico em mitocôndrias, golgi e vesículas isoladas (Fig. 3.3d). Na parede celular, entre células contíguas, evidenciaram-se numerosos plasmodesmas (Fig. 3.3c), porém externo à parede celular, em contato com espaço intercelular (livre de contato com outra célula), constatou-se deposição de material granular correspondendo à MEG (Fig. 3.3d). As Figuras 3.3 e-g mostram a sequência do processo de secreção das substâncias que compõem a ME. Vesículas isoladas a partir do golgi, aproximam-se da periferia da célula (Fig. 3.3d). Ocorre um pequeno rompimento da membrana que delimita a vesícula e inicia-se o processo de liberação da secreção (Fig. 3.3e-f). Segue-se a fusão do restante da membrana da vesícula com a membrana plasmática da célula, culminando com a total liberação da secreção que atravessa as microfibrilas de celulose da parede, depositando-se externamente à esta para constituir a ME (Fig. 3.3g).

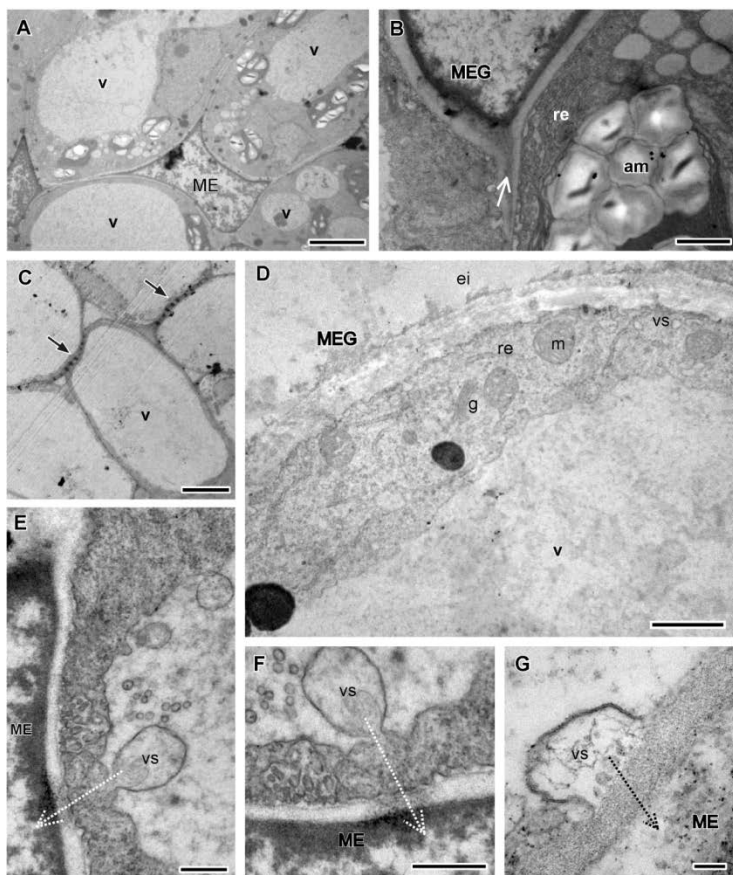
O grande acúmulo de substâncias pécicas entre as células resultou em desprendimento destas e a ME mostrou aspecto fibrilar (MEF; Fig. 3.4a), correspondendo ao observado na figura 3.1e. Quando as células já estão mais distanciadas (Fig. 3.4b) o aspecto da ME é granular (MEG), correspondendo ao observado na figura 3.1f.



**Fig. 3. 1** Eletromicrografias (MEV) de calos de *P. tenuifila* (a,b,e-f) e *P. setacea* (c,d): a matriz extracelular membranosa-MEM (ponta de seta), com superfície lisa, envolvendo calo. b MEM (ponta de seta) na superfície de calo. c, d MEM (pontas de seta) envolvendo externamente as células e matriz extracelular granular-MEG (seta) aderida às paredes de células que desconectaram-se. e matriz extracelular fibrilar-MEF (seta) entre as células em processo de desconexão. f MEG (seta) na face interna da MEM. g MEG (seta) aderida na superfície de células já desconectadas de células vizinhas. Explantes de origem dos calos: a=segmento caulinar; c,d=raiz. Condições do meio de cultura: a,f= 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de ANA; b= 88,5 mM de frutose; 2,5  $\mu$ M de ANA; c,d= 5,0  $\mu$ M de 2,4-D; e,g= 88,5 mM de glicose e 2,5  $\mu$ M de ANA; Barras: a, b, c =50 $\mu$ m; d =25  $\mu$ m; e =10  $\mu$ m; f, g =20  $\mu$ m.

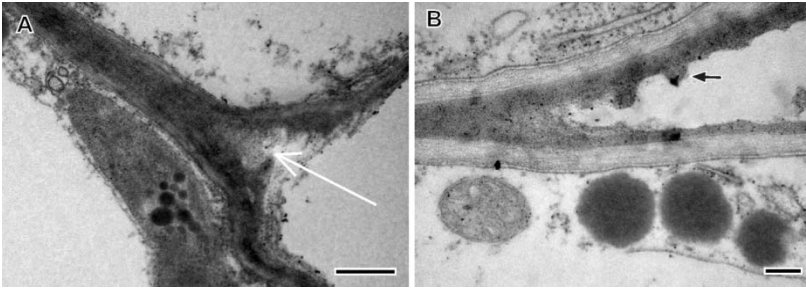


**Fig. 3. 2** Fotomicrografias de secções transversais de calos de *P. tenuifila* (a,c-e) e *P. setacea* (b): a-b aspecto geral de calo mostrando região interna (ri) com células justapostas e regiões periféricas (rp) onde as células desprendem-se. c células com paredes retas (pontas de seta) unidas por reduzido material intercelular que constitui a matriz extracelular (ME). d ME depositada entre células de faces convexas. e ME conspícua entre células, evidenciando reação positiva a substâncias pécticas com uso de vermelho de rutênio. Explantes de origem dos calos: b=raiz; e=cotilédone. Condições do meio de cultura: a,c= 88,5 mM de frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA; b,e= 5,0  $\mu$ M de 2,4-D; d= 88,5 mM de glucose e 1,25  $\mu$ M de ANA; Barras: a =20 $\mu$ m; b =30 $\mu$ m; c,d,e =10 $\mu$ m.



**Fig. 3. 3** Eletromicrografias (MET) de calos de *P. tenuiflora*, produzidos a partir de segmento caulinar: a células da região interna com vacúolos conspícuos (v) e indícios de fusão entre vacúolos menores; substâncias osmiofílicas, constituindo ME, preenchem os espaços intercelulares. b células da região interna do calo com grânulos de amido (am) e retículo endoplasmático (re) conspícuo próximo a parede celular; lamela média (seta) dilatando-se e separando duas células, decorrente de maior deposição de substâncias osmiofílicas (pécticas). c células mais periféricas dos calos com amplos vacúolos (v), protoplasto posicionado na periferia e plasmodesmas (setas) indicando intensa intercomunicação de células vizinhas. d células periféricas do calos com protoplasto rico em mitocôndrias (m), golgi (g), vesículas isoladas (vs) e deposição de MEG. e-g Evidências do processo de secreção de substâncias osmiofílicas que compõem a ME: e vesículas (vs) isoladas

a partir do golgi aproximam-se da periferia da célula. f membrana que delimita vesícula rompe-se e se inicia o processo de liberação da secreção g segue-se a fusão do restante da membrana da vesícula com a membrana plasmática da célula, culminando com a total liberação da secreção através das microfibrilas de celulose da parede, depositando-se externamente à esta para constituir a ME. Barras: a,c=5 $\mu$ m; b,d=1 $\mu$ m; e,f =0,5 $\mu$ m; ,g=0,1 $\mu$ m.



**Fig. 3. 4** Eletromicrografias representativas em MET mostrando o grande acúmulo de substâncias entre as células de calos friáveis de *P. tenuifila*, produzidos a partir de segmento caulinar em diferentes fontes de carbono e concentrações de ANA: a despreendimento celular como resultado do acúmulo de substâncias, formando ME com aspecto fibrilar-MEF (seta branca). b células mais distanciadas apresentando o aspecto da ME granular-MEG (seta preta). Barras: a=0,5  $\mu$ m; b=0,2 $\mu$ m.

### 3.4 DISCUSSÃO

A morfogênese nas plantas, envolve uma organização espacial e temporal da divisão celular, da expansão e da diferenciação de células (Krupková *et al.*, 2007). Assim, acrescentam os autores, a parede celular tem um papel importante no desenvolvimento da planta, o que impõe numerosas limitações espaciais e associações entre as células. Para coordenar corretamente os planos de divisões celulares e expansão das células em desenvolvimento, a deposição ordenada de material da parede celular e sua composição são importantes (Baskin, 2001).

As substâncias pécicas e as proteínas são importantes componentes que fazem parte da parede celular (Evert, 2006; Beck, 2010). A lamela média tem natureza predominantemente pécica (Evert, 2006). As pectinas são altamente hidrofílicas e

seus constituintes principais (ácido poligalacturônico e rhamnogalacturônico) têm alta capacidade de formar géis (Evert, 2006; Beck, 2010). Nos calos de *Passiflora*, as substâncias pécticas foram identificadas como um dos componentes da ME, tal como registrado por Verdeil *et al.* (2001) para calos de côco. Samaj *et al.* (1995), através do tratamento com proteases, observaram que as proteínas também fazem parte da constituição da ME.

Chapman *et al.* (2000) constataram, na embriogênese somática induzida a partir de raiz de *Cichorium*, que proembriões mantém material fibrilar em forma de rede na superfície, parecendo que foi rasgada ou parcialmente rompida durante a expansão do proembrião, o que denominou de rede supraembrionária. Conforme estes autores, esta rede está restrita ao exterior da parede celular podendo estar associada com a degradação da camada que reveste o proembrião. Os autores acrescentam que as células do parênquima que originou os proembriões mantém a superfície lisa. Em *Passiflora* também foi constatado que a ME apresentou-se lisa, ou membranosa, na superfície dos calos. Popielarska-Konieczna *et al.* (2008) ressaltaram que a rede superficial da ME tem recebido atenção dos pesquisadores nos processos de morfogênese, pois a parede celular externa, onde ocorre esta rede, está exposta aos fatores ambientais. Estes autores, analisando a ME em calos derivados endosperma de *Actinidia deliciosa*, observaram a rede de ME na adesão entre células, enquanto na superfície a ME apresentou-se membranosa. Os autores também observaram que no contato das células senescentes com a área morfogênica ocorria esta rede de ME. Popielarska-Konieczna *et al.* (2010), testaram novas técnicas de preparo e análise da ME, tendo em vista que muitos pesquisadores atribuíram a variação das características fibrilar ou granular aos métodos usados. Assim, estes autores prepararam amostras por congelamento e liofilização, evitando possíveis artefatos pela fixação química e desidratação, constatando, em MEV, que *A. deliciosa* apresentava uma matriz superficial dos calos como camada membranosa e estrutura fibrilar de rede extracelular, além de secreção como mucilagem de forma granular em parte da superfície celular. Sendo assim, comprovaram que os procedimentos não estavam modificando o aspecto estrutural da ME. Steinmacher *et al.* (2012) também constataram ME com

estrutura fibrilar e granular durante a embriogênese somática de pupunha. No entanto, concluíram que a ME não apresenta arranjos diferenciados, ao invés disso, apresenta externamente o aspecto liso e internamente é constituída por material depositado em forma fibrilar, em células com recente desprendimento, e/ ou em forma de grânulos, quando as células estão mais distanciadas. Estes resultados correspondem ao que também foi observado no presente estudo em calos de *Passiflora*. A maioria dos estudos com ME refere-se a células morfogênicas, porém Slesak *et al.* (2014) constataram ME com estrutura membranosa-fibrilar em torno de células não morfogênicas de calos de *Rumex*.

A matriz extracelular é uma parte da continuidade da citoesqueleto-membrana plasmática com a função de recepção e transdução de sinais entre as células (Roberts, 1994). Popielarska-Konieczna *et al.* (2014) sugerem que a ME pode estar envolvida com a função de sinalização e proteção estrutural. O caminho da secreção das pectinas foi observado por Steinmacher *et al.* (2012), na embriogênese somática de *Bactris gasipaes* Kunth., através da imunolocalização. Os autores observaram partículas de ouro associadas com as vesículas nas proximidades do retículo endoplasmático, tanto quanto no aparelho de Golgi e estavam claramente associadas com as membranas vesiculares e citoplasmáticas. A análise ultraestrutural das células dos calos de *Passiflora* também revelou indícios de material sendo secretado por vesículas na periferia das células, além de substâncias eletrodensas na parede celular e externamente a esta.

Nos calos de *Passiflora*, a contínua secreção de substâncias pécicas em células periféricas gerou uma deposição frágil entre duas células contíguas, o que, associado à expansão celular, determinou a formação de ME fibrilar. O processo seguiu com a dissolução da lamela média, ou seja, da ME, resultando no desprendimento celular. Sobre a superfície destas células desconectadas restaram resíduos da ME, mais frequentemente na forma granular. As evidências estruturais sugerem que a consistência friável dos calos de *Passiflora* é resultante da desconexão das células periféricas dos calos, que resulta da alteração na ME. Este processo ocorreu nos calos de ambas as espécies de *Passiflora* analisadas, independentemente do tipo de explante que gerou o calo ou do meio de cultura utilizado.



### 3.5 REFERÊNCIAS

- Baskin, T.I. (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. **Protoplasma** **215**: 150-171
- Beck CB (2010) **An introduction to Plant Structure and Development**. New York: Cambridge University Press
- Bevitore R, Popielarska-Konieczna M, Santos EM, Grossi-de-Sá ME, Petrofeza S (2014) Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma** **251**:545-554
- Blehová A, Bobák M, Samaj J, Hlinková E (2010) Changes in the formation of an extracellular matrix surface network during early stages of indirect somatic embryogenesis in *Drosera spathulata*. **Acta Botanica Hungarica** **52**: 23-33
- Bobák M, Samaj J, Hlinkova E, Hlavacka A, Ovecká M (2003/4) Extracellular matrix in early stages of direct somatic embryogenesis of *Drosera spathulata*. **Biologia Plantarum** **47**:161-166
- Chapman A, Blervacq AS, Tissier JP, Delbreil JV, Hilbert JL (2000) Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. I. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways. **Canadian Journal of Botany** **78**: 816–823
- Dubois T, Dubois J, Guedira M, Diop A, Vasseur (1992) SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in root of *Cichorium*. **Annals of Botany** **70**: 119-124
- Dumville JC, Fry SC (2000) Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. **Plant Physiology Biochemistry** **38**:125–140

Evert RF (2006) **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body, Their Structure, Function, and Development.** New Jersey: John Wiley & Sons

Gerlach D (1984) **Botanische mikrotechnik.** Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Gerrits & Smid (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Jornal of Microscopy** **132**: 81-85

Konieczny R, Bohdanowicz J, Czaplicki AZ, Przywara L (2005) Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **83**:201-208

Konieczny R, Swierczynska J, Czaplicki AZ, Bohdanowicz J (2007) Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat. **Plant Cell Reports** **26**: 355-363

Krupková E, Immerzeel P, Pauly M, Schmülling T (2007) The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of Arabidopsis encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. **The Plant Journal** **50**: 735-750

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma** **59**:368-373

Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica** **20**: 257-264.

Pereira CS, Ribeiro JML, Vatulescu AD, Findlay K, MacDougall AJ, Jackson PAP (2011) Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reduction in primary cell wall hydration. **Biomedcentral Plant Biology** 11:1-15

Pilarska M, Czaplicki AZ, Konieczny R (2007) Patterns of pectin epitope expression during shoot and root regeneration in androgenic cultures of two wheat cultivars. **Acta Biologica Cracoviensia** 49: 69-72

Popielarska-Konieczna M, Bohdanowicz J, Starnawska E (2010) Extra-cellular matrix of plant callus tissue visualized by ESEM and SEM. **Protoplasma** 247:121-125

Popielarska-Konieczna M, Kozieradzka-Kiszkurno M, Swierczynska J, Goralski G, Slésak H, Bohdanowicz (2008) Ultrastructure and histochemical analysis of extracellular matrix surface network in kiwifruit endosperm-derived callus culture. **Plant Cell Reports** 27: 1137-1145

Pilarska M, Knox JP, Konieczny R (2013) Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 115:35-44

Pilarska M, Popielarska-Konieczna M, Slesak H, Kozieradzka-Kiszkurno M, Goralski G, Konieczny R, Bohdanowicz J, Kuta E (2014) Extracellular matrix surface network is associated with non-morphogenic calli of *Helianthus tuberosus* cv. Albik produced from various explants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 83:67-73

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** 17: 208-212 [Dept. Anatomy, Harvard Medical School, Boston, MA]

Roberts K (1994). The plant extracellular matrix: in a new expansive mood. **Current Opinion in Cell Biology** 6: 688–694

Samaj J, Bobak M, Blehova A, Kristin J, Auxtova-Samajova O (1995) Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. **Protoplasma** **186**: 45-49

Samaj J, Baluska F, Bobák M, Volkmann D (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody J1M4. **Plant Cell Reports** **18**: 369-374

Samaj J, Bobák M, Blehová A, Pretová A (2005) Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In: Mujib A, Samaj J (eds) **Somatic embryogenesis Plant Cell Monographs**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 35-50

Slesak H, Lisznianska M, Popielarska-Konieczna M, Goralski, G, Sliwinski E, Joachimiaka AJ (2014) Micropropagation protocol for the hybrid sorrel *Rumex tianschanicus* × *Rumex patientia*, an energy plant. Histological, SEM and flow cytometric analyses. **Industrial Crops and Products** **62**: 156-165

Sondhal MR, Salisbury JL, Sharp WR (1979) SEM characterization of embryonic tissue and globular embryos during high-frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells, **Planzenphysiol** **94**: 185-188

Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43

Steinmacher DA, Saare-Surminski K, Lieberei R (2012) Arabinogalactan proteins and extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. **Physiologia Plantarum** **146**: 336-349

Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, Nicole M (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany** **88**:9-18

Yusoff N F M, Alwee SSRS, Abdullah MO, Chai-Ling H, Namasivayam P (2012) A time course anatomical analysis of callogenesis from young leaf explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research** 24: 1330-1341



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do estudo sobre a formação de calos de *P. setacea* a partir de diferentes tipos de explantes, revelaram a necessidade do uso de 2,4-D, sendo que concentrações mais elevadas (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) resultaram em maiores percentagens de formação de calos. Calos originados de hipocótilo em 5,0  $\mu\text{M}$  e calos de segmento nodal foliar em 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentaram características histológicas que indicam grande potencial para formação de projeções globulares indicando o acúmulo de biomassa, sendo importantes para estudos futuros sobre a produção de metabólitos secundários.

Os resultados de extração de metabólitos indicaram o potencial das culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, sendo uma alternativa biotecnológica para a produção de fenólicos totais, flavonóides, luteína, zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno. Pesquisas futuras, com calos desta espécie, podem ser otimizadas com o intuito de aumentar a produção destes compostos ou até mesmo gerar a produção de compostos não detectados neste trabalho. Assim, com maior produção de metabólitos secundários poderá ser viabilizada a indução da atividade antioxidante dos calos. Isto pode ser obtido através de manipulações de reguladores de crescimento, níveis de diferenciação, fornecimento de precursores e elicitação. Estas manipulações têm sido utilizadas com sucesso na otimização da produção de metabólitos secundários em outras espécies.

Com base em estudo ultraestrutural foi possível verificar que o acúmulo de substâncias entre as células periféricas dos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* compõem a matriz extracelular (ME). Aspectos da constituição química e ultraestrutural da ME podem ser de grande importância em pesquisas que necessitem esclarecimentos sobre a desconexão intercelular, como no caso de formação de calos friáveis.