



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**



**ISABELA SOUZA COCCORESE CONCEIÇÃO**

**ESTUDO DA CALOGÊNESE EM *Physalis peruviana* L.:  
ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO,  
HISTOLÓGICO E FITOQUÍMICO**

Feira de Santana – BA

2023

**ISABELA SOUZA COCCORESE CONCEIÇÃO**

**ESTUDO DA CALOGÊNESE EM *Physalis peruviana* L.:  
ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO,  
HISTOLÓGICO E FITOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana  
Coorientadora: Dra. Andressa Priscila Piancó Santos Lima

Feira de Santana - BA

2023

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

C743

Conceição, Isabela Souza Coccoresse.

Estudo da calogênese em *Physalis peruviana* L.: aspectos morfofisiológico, bioquímico, histológico e fitoquímico / Isabela Souza Coccoresse Conceição. – 2023.  
69 f.: il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Coorientadora: Andressa Priscila Piancó Santos Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2023.

1. Genética. 2. Agricultura. 3. *Physalis peruviana* L. I. Título. II. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 631.52

## BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Fábio Ribeiro Garcia  
(Instituto Federal do Pará)



---

Profa. Dra. Carolina Oliveira de Cerqueira Lima  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



---

Profa. Dra. Andressa Priscila Piancó Santos Lima  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Coorientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu chegar até aqui;

Aos meus pais, pelo apoio infindável;

Ao meu marido, pela paciência e compreensão;

À coorientadora Andressa, pela incrível disposição em me ajudar nas muitas partes desse trabalho. Muito obrigada!

Ao orientador José Raniere, pelo aceite da orientação e pela confiança;

À UEFS, ao Programa RGV e ao laboratório LCTV, pelo suporte e infraestrutura para realização desse trabalho;

Aos colegas Uaslei e Junior, pelas muitas dicas nos métodos da curva de crescimento;

Ao colega Robson e ao laboratório LAGER, pelo amparo nas análises bioquímicas;

À professora Cláudia e ao laboratório LAMIV, pelo auxílio nas análises histológicas;

À professora Danielle, à Geovanna, e ao laboratório LAEX, pela ajuda nas análises fitoquímicas;

Aos colegas da turma 2020.1, pela inclusão e pela distração nos dias cansativos;

À quase coorientadora Luane, pelo apoio no início do mestrado;

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho: Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A *Physalis peruviana* L. tem atraído atenção dos consumidores e do mercado produtor pela versatilidade no consumo e potencial fitoterápico, com produção de substâncias de ações comprovadas. No entanto, o teor de compostos encontrados nas plantas é baixo para exploração comercial, podendo haver também alterações nas características físico-químicas devido aos fatores ambientais. Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais possibilita a produção *in vitro* de metabólitos secundários, especialmente a partir de calos, visto que é possível a obtenção de uma maior quantidade de material vegetal e permitindo a exploração sustentável desta espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi promover a calogênese em diferentes tipos de explantes de *Physalis peruviana* caracterizando sua histomorfologia e metabolismo primário e secundário. Para indução de calos foram utilizadas folhas, cotilédones e hipocótilos em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, e a análise posterior permitiu eleger o explante hipocótilo suplementado com 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP e 9,00  $\mu\text{M}$  de 2,4-D como melhor tratamento. A curva de crescimento dos calos foi plotada, com determinação de massa fresca em intervalo de sete dias, e demonstrou a presença de cinco fases. Seguindo a curva de crescimento, foi realizada análise histológica, a qual demonstrou meristemóides e constante presença de vascularização. Foram também quantificados metabólitos primários, indicando grande quantidade de açúcares solúveis totais e aminoácidos, e realizada a triagem fitoquímica, que atestou a presença de alcalóides e compostos fenólicos.

**Palavras-chave:** Cultivo *in vitro*. Calos. Camapú. Cape gooseberry. Metabólitos secundários.

## ABSTRACT

*Physalis peruviana* L. has attracted the attention of consumers and the producer market for its versatility in consumption and phytotherapeutic potential, with the production of substances with proven actions. However, the content of compounds found in the plants is low for commercial exploitation, and there may also be alterations in the physicochemical characteristics due to environmental factors. In this sense, the culture of plant tissues enables the in vitro production of secondary metabolites, especially from callus, since it is possible to obtain a greater amount of plant material and allowing the sustainable exploitation of this species. Thus, the objective of this work was to promote callogenesis in different types of *Physalis peruviana* explants, characterizing their histomorphology and primary and secondary metabolism. For callus induction, leaves, cotyledons and hypocotyls were used in MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and BAP, and subsequent analysis allowed choosing the hypocotyl explant supplemented with 1.11  $\mu\text{M}$  of BAP and 9.00  $\mu\text{M}$  of 2,4-D as the best treatment. The callus growth curve was plotted, with determination of fresh mass in an interval of seven days and demonstrated the presence of five phases. Following the growth curve, histological analysis was performed, which demonstrated meristemoids and constant presence of vascularization. Primary metabolites were also quantified, indicating a large amount of total soluble sugars and amino acids, and phytochemical screening was carried out, which attested to the presence of alkaloids and phenolic compounds.

**Keywords:** In vitro culture. Calluses. Camapú. Cape gooseberry. Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Folhas, flor e fruto de *Physalis peruviana* L. (RAMÍREZ *et al.*, 2013)
- FIGURA 2 Quadro comparativo entre o desenvolvimento da organogênese direta e indireta (Adaptado de GEORGE, 1996)
- FIGURA 3 Desenvolvimento da embriogênese somática (ZIMMERMAN, 1993)
- FIGURA 4 Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)
- FIGURA 5 Calos gerados do explante cotilédone aos 40 dias de idade. T2 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T3 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T4 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T5 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T6 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T7 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T13 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T14 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T15 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. O tratamento controle T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontra presente pois não gerou calos. Barra = 1 cm
- FIGURA 6 Calos gerados do explante folha aos 40 dias de idade. T3 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T4 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T5 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T6 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T7 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T14 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T15 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP) e T13 (9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm



FIGURA 7 Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T4 = 1,13  $\mu$ M de 2,4-D e 0  $\mu$ M de BAP, T5 = 1,13  $\mu$ M de 2,4-D e 0,55  $\mu$ M de BAP, T6 = 1,13  $\mu$ M de 2,4-D e 1,11  $\mu$ M de BAP, T7 = 2,26  $\mu$ M de 2,4-D e 0  $\mu$ M de BAP, T8 = 2,26  $\mu$ M de 2,4-D e 0,55  $\mu$ M de BAP, T9 = 2,26  $\mu$ M de 2,4-D e 1,11  $\mu$ M de BAP, T10 = 4,53  $\mu$ M de 2,4-D e 0  $\mu$ M de BAP, T11 = 4,53  $\mu$ M de 2,4-D e 0,55  $\mu$ M de BAP, T12 = 4,53  $\mu$ M de 2,4-D e 1,11  $\mu$ M de BAP, T13 = 9  $\mu$ M de 2,4-D e 0  $\mu$ M de BAP, T14 = 9  $\mu$ M de 2,4-D e 0,55  $\mu$ M de BAP, T15 = 9  $\mu$ M de 2,4-D e 1,11  $\mu$ M de BAP, T4L, T12L e T15L= Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T4, T12 e T15, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu$ M de 2,4-D e 0  $\mu$ M de BAP), T2 (0  $\mu$ M de 2,4-D e 0,55  $\mu$ M de BAP) e T3 (0  $\mu$ M de 2,4-D e 1,11  $\mu$ M de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

FIGURA 8 Calos gerados do explante segmento internodal aos 40 dias idade. T4 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T5 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T6 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T7 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T8 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T9 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T10 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T11 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T12 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T13 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T14 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T15 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP), T2 (0  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP) e T3(0  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

FIGURA 9 Calos gerados do explante segmento nodal aos 40 dias de idade. T4 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T5= 9  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T6 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T7 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T8 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T9 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T10 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T11 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T12 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T13 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T14 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T15 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, 11L, T13L e T14L= Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T11, T13 e T14, respectivamente. Os

tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP) e T3(0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

FIGURA 10 Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T3 = 0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T4 = 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T5= 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T6 = 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T7 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T8 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T9 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T10 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T11 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T12 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, , T14 = 36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T15 = 36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T8L, T9L e T10L= Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T8, T9 e T10, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP) e T13 (36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

FIGURA 11 Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T7 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP), T3(0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP), T4 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP), T5 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP) e T6 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

FIGURA 12 Calos gerados do explante nó cotiledonar aos 40 dias de idade. T7 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP, T9L e T10L= Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T9 e T10, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP), T3(0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP),

T4 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP), T5 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP) e T6 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm

- FIGURA 13 Curva de crescimento de calos de *Physalis peruviana* obtidos a partir de explantes de hipocótilo inoculados em meio de cultura suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Fase I= Lag, II = exponencial, III = linear, IV = desaceleração, V = declínio
- FIGURA 14 Calos do explante hipocótilo de *Physalis peruviana* em cada intervalo da curva de crescimento. Barra = 1 cm
- FIGURA 15 Quantificação de açúcares solúveis totais (A) e açúcares redutores (B) em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca
- FIGURA 16 Quantificação de proteínas totais em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca
- FIGURA 17 Quantificação de aminoácidos em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca
- FIGURA 18 Cortes anatômicos de calos de *Physalis peruviana*. A e B = células em atividade mitótica, barra A = 200 $\mu\text{m}$  e barra B = 100 $\mu\text{m}$ . C e D = meristemóides com início de vascularização, e elementos vasculares traqueais (seta), barra = 100 $\mu\text{m}$ . E = conteúdo vacuolar (material de reserva), barra = 100 $\mu\text{m}$ . F = procâmbio, barra = 100 $\mu\text{m}$ . G = pseudomeristemóide em crescimento, barra = 100 $\mu\text{m}$ . mr = meristemóide; pr = procâmbio; pm = pseudomeristemóide
- FIGURA 19 Perfil das células encontradas em calos de *Physalis peruviana* com 49 dias de inoculados e coradas com TTC. A e C2 = Estruturas embriogênicas polarizadas, resultado das primeiras divisões celulares. B e C1= células embriogênicas isoladas. Barra = 100 $\mu\text{m}$
- FIGURA 20 Análises fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*. A = Teste de alcalóides utilizando o reagente de Dragendorff. B = Teste de compostos fenólicos utilizando o cloreto férrico 1%.

C = Teste para esteróides e terpenos utilizando o reagente de Liebermann-Burchard D = Teste para flavonóides utilizando cloreto de alumínio 2%. D = Teste para cumarinas em ccd utilizando hidróxido de sódio como reagente. C28c = extrato metanólico de calos aos 28 dias de inoculação; C28r = extrato de calos aos 28 dias de inoculação + reagente; C49c = extrato metanólico de calos aos 49 dias de inoculação; C49r = extrato de calos aos 49 dias de inoculação + reagente; P = padrão: reagente + água destilada

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (folha, cotilédone ou hipocótilo).
- TABELA 2 Médias percentuais (%) de explantes responsivos a partir de três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.
- TABELA 3 Média da massa fresca em miligramas em três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.
- TABELA 4 Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 5 Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (segmentos nodal, internodal e hipocótilo).
- TABELA 6 Médias percentuais (%) de explantes responsivos a partir de três tipos de explantes (hipocótilo, segmento nodal e intermodal) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 7 Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de três tipos de explantes (hipocótilo e segmentos nodal e internodal) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.
- TABELA 8 Média geral da massa fresca em miligramas em três tipos de explantes (hipocótilo e segmentos nodal e internodal) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 9 Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (nó cotiledonar e hipocótilo).

- TABELA 10 Médias percentuais (%) da variável explantes responsivos de dois tipos de explantes (nó cotiledonar e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 11 Média geral da massa fresca em miligramas de calos de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 12 Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de dois explantes (hipocótilo e nó cotiledonar) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D.
- TABELA 13 Rendimento dos extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*.
- TABELA 14 Perfil fitoquímico nos extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<i>Physalis peruviana</i> L.	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	Cultura de tecidos vegetais	<b>19</b>
<b>2.3.</b>	Análise histológica	<b>22</b>
<b>2.4.</b>	Análises de produção de metabólitos primários e secundários	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1.</b>	Material vegetal	<b>25</b>
<b>3.2.</b>	Indução de calos sob diferentes concentrações de 2,4-D, BAP e tipos de explantes	<b>26</b>
3.2.1.	Explantes foliar, cotiledonar e hipocótilo	<b>26</b>
3.2.2.	Explantes nodal, internodais e hipocótilo	<b>26</b>
3.2.3.	Explantes nó cotiledonar e hipocótilo	<b>26</b>
3.2.4.	Avaliações	<b>27</b>
<b>3.3.</b>	Condições gerais de cultivo in vitro	<b>27</b>
<b>3.4.</b>	Curva de crescimento dos calos	<b>27</b>
<b>3.5.</b>	Caracterização bioquímica	<b>27</b>
<b>3.6.</b>	Caracterização histológica	<b>28</b>
<b>3.7.</b>	Análise da viabilidade celular	<b>29</b>
<b>3.8.</b>	Caracterização fitoquímica	<b>29</b>
<b>3.9.</b>	Análise estatística	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
<b>4.1.</b>	Indução de calos em <i>Physalis peruviana</i>	<b>30</b>
4.1.1.	Explantes foliar, cotiledonar e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP	<b>30</b>
4.1.2.	Explantes nodal, internodais e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP	<b>38</b>
4.1.3.	Explantes nó cotiledonar e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP	<b>45</b>
<b>4.2.</b>	Curva de crescimento de calos de <i>Physalis peruviana</i>	<b>49</b>
<b>4.3.</b>	Caracterização bioquímica	<b>51</b>
<b>4.4.</b>	Caracterização histológica	<b>54</b>
<b>4.5.</b>	Avaliação da viabilidade celular dos calos	<b>56</b>
<b>4.6.</b>	Caracterização fitoquímica	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Physalis* L., pertencente à família Solanaceae, contém aproximadamente 90 espécies, e apenas 14 delas ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. No Brasil são encontradas as espécies *Physalis alkekengi* L., *Physalis ampla* Waterfall, *Physalis angulata* L., *Physalis cordata* Mill., *Physalis ignota* Britton, *Physalis peruviana* L., *Physalis pruinosa* L., *Physalis pubescens* L. e *Physalis viscosa* L., as quais apresentam ocorrência em todas as regiões do país (STEHMANN; KNAPP, 2020). A *Physalis peruviana* L. (Solanaceae) se derivou da América do Sul e seus frutos são bastante comercializados em países tropicais e subtropicais (GONZÁLEZ *et al.*, 2008; NOVOA *et al.*, 2006).

A *P. peruviana* conquista a atenção de diversos mercados consumidores devido às variadas opções de consumo de seus frutos: fresco, desidratado, ou no preparo de diferentes pratos (VILLEGAS, 2009). Somado a isto, fatores de qualidade como as características físico-químicas e nutricionais de seus frutos agregam valor à sua comercialização (RODRIGUES *et al.*, 2014), visto que, essa espécie é fonte de vitamina C, compostos fenólicos, vitaminas B3 e B6, e também muito se distingue no mercado farmacêutico, em razão de seu potencial fitoterápico, uma vez que apresenta diversas propriedades medicinais, tais como efeito diurético, antisséptico e analgésico (OLIVARES-TENORIO *et al.*, 2016; PUENTE *et al.*, 2011). Esses benefícios são acarretados pela presença de metabólitos que são produzidos nesse gênero, os principais são as fisalinas, derivados esteroidais com ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

No entanto, o teor de compostos encontrados nas plantas é baixo para exploração comercial (OLIVEIRA *et al.*, 2013), podendo haver também alterações nas características físico-químicas devido ao local de cultivo, luminosidade, temperatura, regime hídrico e fatores bióticos (SOUZA *et al.*, 2017). Ademais, esta espécie apresenta autopolinização e 53% de polinização cruzada (LAGOS *et al.*, 2008), possuindo alta variabilidade genética que por sua vez pode interferir na composição e qualidade das plantas. Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais possibilita a propagação em larga escala de genótipos selecionados, com manutenção da fidelidade genética e produção *in vitro* de metabólitos secundários, permitindo a exploração sustentável desta espécie.

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas, que cultivam partes de plantas, denominadas explantes, em meio de cultura contendo todos os nutrientes necessários, em condições assépticas e



ambiente controlado. Sendo amplamente utilizada na propagação in vitro de plantas, cuja aplicação é fundamentada pela totipotência celular, que prega que qualquer célula presente no vegetal possui condições genéticas primordiais à regeneração de uma planta inteira (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Neste contexto, estudos demonstram a viabilidade de aplicação da cultura de tecidos vegetais na propagação indireta de *P. peruviana* (GUPTA; GOVIL, 1990; LASHIN; ELHAW, 2016; MASCARENHAS; SANTANA; LIMA-BRITO, 2019).

Os processos de regeneração da propagação in vitro são a organogênese e a embriogênese somática (CONCEIÇÃO; CARMO; LIMA-BRITO, 2021), e se subdividem em vias direta ou indireta. Pela via indireta de ambos os processos, é necessária uma fase intermediária de calos e para que isso aconteça, as células do explante em questão se desdiferenciam, havendo então uma proliferação de calos, se valendo da ação de reguladores vegetais específicos, geralmente auxinas e citocininas combinadas (NAMASIVAYAM, 2007), visto que o balanço hormonal entre auxinas e citocininas promove formação de calo e induz a geração de gemas ou raízes a partir deles (TAIZ *et al.*, 2017). Dessa forma, os calos podem ser utilizados para organogênese, embriogênese e produção de metabólitos secundários.

A utilização das técnicas da cultura de tecidos vegetais na obtenção de metabólitos secundários, de forma eficiente e dentro de um curto período para aplicação comercial, supera os métodos convencionais, uma vez que estes demandam tempo para crescimento (CHANDRAN *et al.*, 2020), além de estarem suscetíveis a fatores edafoclimáticos. A biossíntese de metabólitos secundários, os quais ajudam as plantas a interagir com o ambiente biótico e abiótico, é limitada a alguns tipos de células e tecidos específicos, tornando a produção in vitro desses metabólitos um ótimo recurso especialmente a partir de calos, visto que é possível a obtenção de quantidade maior de material vegetal (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020; SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). Neste sentido, há estudos que atestam a eficiência da cultura de tecidos vegetais na obtenção de metabólitos secundários em *Physalis*: Mastuti e Rosyidah (2021) demonstraram a presença de esteróides em *P. angulata*, e Salim *et al.* (2019) atestaram a presença de diferentes metabólitos na mesma espécie. Já Lashin e Elhaw (2016) determinaram as taxas de metabólitos secundários presentes em *P. peruviana*.

Além disso, na literatura existem alguns trabalhos que utilizam a propagação indireta in vitro de *P. peruviana*. Gupta e Govil (1990) estudaram morfogeneticamente calos dessa espécie cultivados em diferentes meios de cultura. Mascarenhas, Santana e Lima-Brito (2019) estabeleceram protocolo de organogênese direta e indireta para *P. peruviana*. Não foram encontradas publicações com embriogênese somática para *P. peruviana*, tampouco com calogênese associado a análises químicas.

Dessa forma, atrelada ao potencial econômico de *P. peruviana* é importante realizar estudos de calogênese in vitro na espécie visando avaliar o potencial dos calos obtidos. Portanto, o objetivo deste trabalho é promover a calogênese em diferentes tipos de explantes de *P. peruviana* caracterizando sua histomorfologia e metabolismo primário e secundário.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Physalis peruviana* L.

A *Physalis peruviana* (Figura 1), pertencente à família Solanaceae, é mais conhecida por “fisális ou camapú no Brasil e apresenta nomes diferentes em outros países, como por exemplo: *uchuva* na Colômbia, *uvilla* no Equador ou *cape gooseberry* em países com língua inglesa (PUENTE *et al.*, 2011). É uma cultura comercializada em países tropicais e subtropicais principalmente pelas características nutricionais, medicinais e decorativas dos frutos, bem como pelo potencial medicinal de outras partes da planta, como folhas e raízes (RUFATO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017; YILDIZ *et al.*, 2015). No Brasil, esta fruta é comercializada a preços altos, devido à importação, uma vez que a produção no país ainda é escassa sendo restrita a algumas cidades do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (LIMA *et al.*, 2013).

A *P. peruviana* apresenta capacidade de crescimento e desenvolvimento em uma abrangente faixa de altitude até 3300 m acima do nível do mar, também suporta baixas temperaturas, sendo o mínimo de 10°C, caso esteja fora dessa faixa, seu crescimento, floração ou frutificação podem ser afetados (PUENTE *et al.*, 2011). Além do mais, a espécie consegue crescer em solo pobre e com baixa necessidade de fertilização, desde que bem drenado (TAPIA; FRIES,

2007). No Brasil, a fisális é tratada como fruta exótica, e seus frutos são geralmente consumidos frescos em saladas, ou como ingrediente na produção de doces, geleias, sucos, sorvetes e iogurtes, além de ser também muito relatado o uso decorativo em sobremesas ou bolos, e seu cálice, envoltório do fruto, utilizado no artesanato (MUNIZ; MOLINA; MUNIZ, 2015).



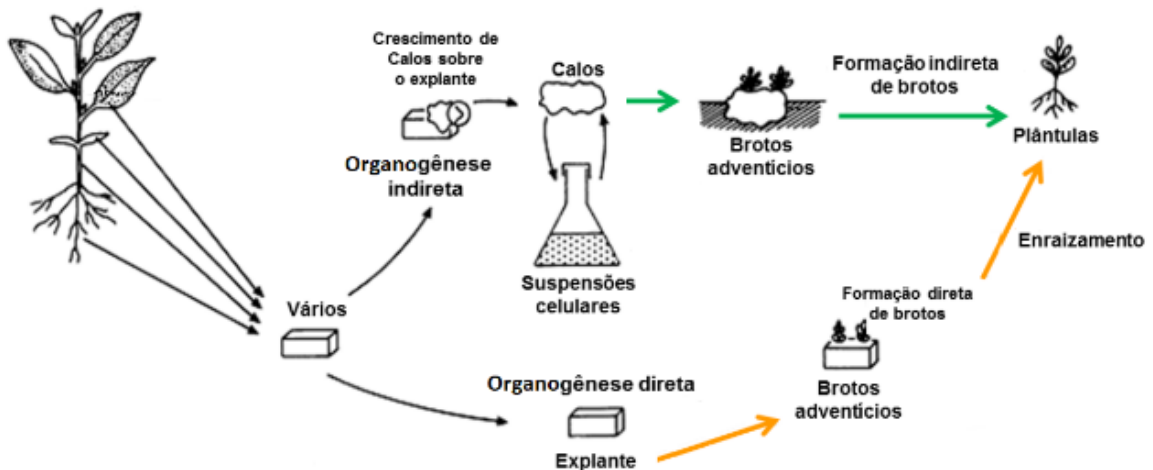
**Figura 1.** Folhas, flor e fruto de *Physalis peruviana* L. (RAMÍREZ *et al.*, 2013)

Esta espécie também muito se distingue no mercado farmacêutico em razão de seu potencial fitoterápico, uma vez que apresenta diversas propriedades medicinais, tais como: efeito diurético, antisséptico, analgésico, antiespasmódico, além de fortalecer o nervo óptico e aliviar problemas de garganta. Ademais, é fonte de vitamina C, compostos fenólicos, vitaminas B3 e B6, minerais, fibras, flavonóides, e apresenta atividade antioxidante. Além de seu fruto, outras partes dessa planta, como raízes e folhas, foram associadas a efeitos benéficos à saúde, sendo eles efeitos cardioprotetores, antitumorais, antidiabéticos, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos (OLIVARES-TENORIO *et al.*, 2016; PUENTE *et al.*, 2011). Esses benefícios são devido à presença de metabólitos produzidos nesse gênero, sendo os principais as fisalinas (OLIVEIRA, 2013). Mesmo com todo esse potencial farmacêutico, existem dificuldades na obtenção desses metabólitos uma vez que são produzidos em baixa quantidade nas plantas. Como possibilidade de resolução utiliza-se a técnica da cultura de tecidos *in vitro*, pois é possível a propagação em larga escala, obtendo uma grande quantidade de compostos bioativos.

## 2.2. Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é amplamente utilizada na agricultura em geral e apresenta como ramo principal a técnica da micropropagação. Esta retrata como princípio básico, o cultivo de explantes, seja este uma célula, tecido ou órgão vegetal, em condições assépticas e ambiente controlado. O objetivo central é a produção de plantas clones, ou seja, com genoma igual ao da planta-mãe, sendo essa uma capacidade embasada pela totipotência celular, que vai demonstrar a aptidão de qualquer célula vegetal em regenerar-se numa planta nova inteira, uma vez que possui toda informação genética necessária para isso (ANDRADE, 2002; MROGINSKI; ROCA, 1993; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

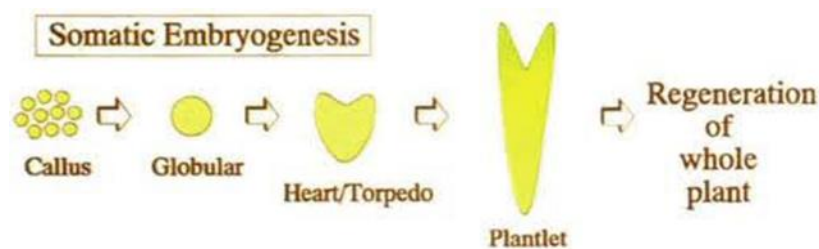
A técnica da regeneração se subdivide em duas rotas: a organogênese e a embriogênese somática (CONCEIÇÃO; CARMO; LIMA-BRITO, 2021). A organogênese direta se apresenta assim, pois durante seu desenvolvimento, os explantes geram brotos e raízes sem passar por estágio intermediário algum, já na organogênese indireta é necessário um estágio intermediário chamado calo, caracterizado por ser um acumulado de células (Figura 1) (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021).



**Figura 2.** Quadro comparativo entre o desenvolvimento da organogênese direta e indireta (Adaptado de GEORGE, 1996).

A embriogênese somática direta gera embriões diretamente do explante, e a indireta apresenta o explante perpassando pela fase de calo com células acumuladas e desdiferenciadas, que se rediferenciam em células embriogênicas, gerando então os embriões somáticos (CARVALHO *et al.*, 2006a).

Na embriogênese somática, durante todo seu desenvolvimento, os embriões passam por estádios embriológicos (Figura 2). Na fase da desdiferenciação de células somáticas, as quais voltam ao estado inicial meristemático, é necessária a presença de auxina combinada a citocinina no meio de cultura, uma vez que esse balanço fitormonal estimula a rediferenciação e morfogênese efetiva do crescimento embrionário. São formados então os pró-embriões, que poderão entrar na fase de maturação. A maturação desses embriões sucede-se através dos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Na fase de maturação é comum a incorporação de agentes osmóticos ao meio de cultura, como por exemplo, o ABA (ácido abscísico) e PEG (polietilenoglicol), bem como substâncias de reserva para os embriões como a sacarose ou outros tipos de carboidratos (ZIMMERMAN, 1993).



**Figura 3.** Desenvolvimento da embriogênese somática (ZIMMERMAN, 1993)

Cada estágio da fase de maturação dos embriões somáticos tem características próprias que auxiliam na sua identificação. O estágio globular se caracteriza por apresentar um acumulado de células em forma de globo e simetria radial. A partir daqui começa o estágio cordiforme, demonstrando a transição de simetria para bilateral. O estágio torpedo então se inicia, caracterizado pelo início da diferenciação dos cotilédones, e uma vez estes já bem diferenciados, caracteriza o estágio cotiledonar. Após o último estágio, o embrião entra na fase de conversão em plântula, com seus meristemas apicais estruturados, seguido pela perda de água dos embriões (MORDHORST *et al.*, 1997; TAIZ *et al.*, 2017).

A embriogênese somática se mostra bastante vantajosa para multiplicação *in vitro* de plantas, uma vez que apresenta taxas altas de multiplicação em contraponto com as outras técnicas de propagação vegetal, além da capacidade de permuta de genes (plantas geneticamente iguais à planta-mãe), pela qual se pode utilizar esta técnica em trabalhos de melhoramento de plantas (CARVALHO *et al.*, 2006b; DEO *et al.*, 2010).

Na literatura já existem alguns trabalhos que utilizam a propagação indireta *in vitro* de *P. peruviana*. Gupta e Govil (1990) estudaram morfogeneticamente calos dessa espécie cultivados em diferentes meios de cultura suplementado com diferentes reguladores vegetais. Lashin e Elhaw (2016) determinaram as taxas de metabólitos secundários presentes em diferentes tecidos e calos oriundos de folhas de *P. peruviana* sob suplementação de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético). Mascarenhas, Santana e Lima-Brito (2019) estabeleceram protocolo de organogênese direta e indireta para *P. peruviana* utilizando explantes foliares e nó cotiledonar em meio de cultura suplementado com BAP. Não foram encontrados trabalhos com protocolo de embriogênese somática para *P. peruviana*, porém há relatos para outras espécies do gênero. Escobar-Guzmán *et al.* (2009) apresentaram um protocolo para induzir a formação de embriões somáticos e regeneração vegetal em *P. ixocarpa* Brot. utilizando anteras como explantes em meio de cultura com uma combinação de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e vitamina B12. Posteriormente, Yousry (2013) desenvolveu um protocolo, para *P. pubescens* L. utilizando discos foliares como explantes e os reguladores vegetais 2,4-D e BAP combinados e obteve calos pró-embriionários.

A calogênese viabiliza a propagação *in vitro*, sendo necessário para isso a adição de reguladores vegetais ao meio de cultura, uma vez que sua ação propicia a desdiferenciação e rediferenciação celular (SANTOS *et al.*, 2013). As auxinas são muito utilizadas, pois caracteriza uma entre várias classes de hormônios vegetais que promovem o desenvolvimento de nós e raízes adventícias e formação de calos além de regular a morfogênese, já as citocininas são eficazes em promover a multiplicação e indução da organogênese, além de induzir a geração de gemas ou raízes a partir de calos (TAIZ *et al.*, 2017; VIETEZ; SAN-JOSÉ, 1996). O balanço hormonal entre auxinas e citocininas traduz respostas diferentes em culturas *in vitro*, , numa proporção com mais auxina é induzido a formação de raízes, e com mais citocinina induz a formação de brotos, e numa

proporção intermediária ocorre proliferação de células desdiferenciadas, como calos, na presença de combinações de reguladores (TAIZ *et al.*, 2017; VIETEZ; SAN-JOSÉ, 1996). Essas respostas podem variar de acordo com a espécie em estudo e dos níveis endógenos dos fitormônios na planta.

O estudo dos calos é importante, pois sua descrição morfológica e bioquímica pode demonstrar o seu desenvolvimento pelo processo morfogenético *in vitro* de tecidos vegetais. Para isso, é importante reconhecer as diversas fases de crescimento do calo, que são indução, divisão e diferenciação celular, certificados através da curva de crescimento do calo, apresentada em seis fases típicas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionário e declínio (VASCONCELOS *et al.*, 2012). O estabelecimento da curva de crescimento de calos é de grande importância, pois através dela consegue-se identificar suas fases distintas, além dos processos essenciais ao estudo cinético do crescimento dos calos de cada espécie. Através da curva de crescimento também é possível indicar o momento apropriado de transferência dos calos para um novo meio de cultura, ou o momento de sua utilização em suspensões celulares, objetivando a produção de metabólitos secundários (SOARES, 2003).

A fase lag é a primeira fase da curva de crescimento, na qual as células se preparam para a divisão celular e produção de energia, é nela que ocorre o início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas; a segunda fase é a chamada exponencial, nesse período ocorre a máxima divisão celular, já a fase linear, terceira fase, é caracterizada pela diminuição da divisão celular e aumento da área das células; a quarta fase, denominada desaceleração, é aquela que apresenta maior produção de metabólitos secundários, e nesse período os calos precisam ser transferidos para um novo meio de cultura, uma vez que ocorre a redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas; a fase estacionária apresenta ausência de divisão celular ou aumento de peso, porém grande acúmulo de metabólitos secundários, e a última fase, denominada declínio se caracteriza pela perda de peso devido à morte celular (SILVA *et al.*, 2020).

### **2.3. Análise histológica**

As ferramentas e técnicas histomorfológicas utilizadas no intuito de interpretar e analisar o processo de regeneração vegetal *in vitro* são essenciais, visto que estas análises conseguem distinguir alterações celulares, identificar a formação de estruturas, e avaliar seu desenvolvimento

em geral. Ao passo que as análises morfológicas podem definir a via de regeneração proporcionando assim uma compreensão melhor da morfogênese *in vitro*, e aprimorando protocolos em cultura de tecidos (FILIPPI, 2000).

Através de análises histomorfológicas em calos organogênicos, é possível inferir a origem dos tecidos e órgãos, bem como elucidar a estrutura celular e indicar o potencial de acúmulo de biomassa e síntese de metabólitos secundários. Já para calos com potencial embriogênico, pode-se, pelas análises histológicas, investigar o desenvolvimento fisiológico da geração dos embriões somáticos, bem como interpretar sua origem, falta de conversão ou anormalidades. Também permite a caracterização das células embriogênicas, apresentando suas particularidades típicas como tamanho diminuto (100-200µm), conteúdo citoplasmático concentrado, núcleo volumoso quando comparado às outras organelas, vacúolos reduzidos, presença de grãos de amido, além de se apresentarem como células jovens (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; WEST; HARADA, 1993).

#### **2.4. Análises de produção de metabólitos primários e secundários**

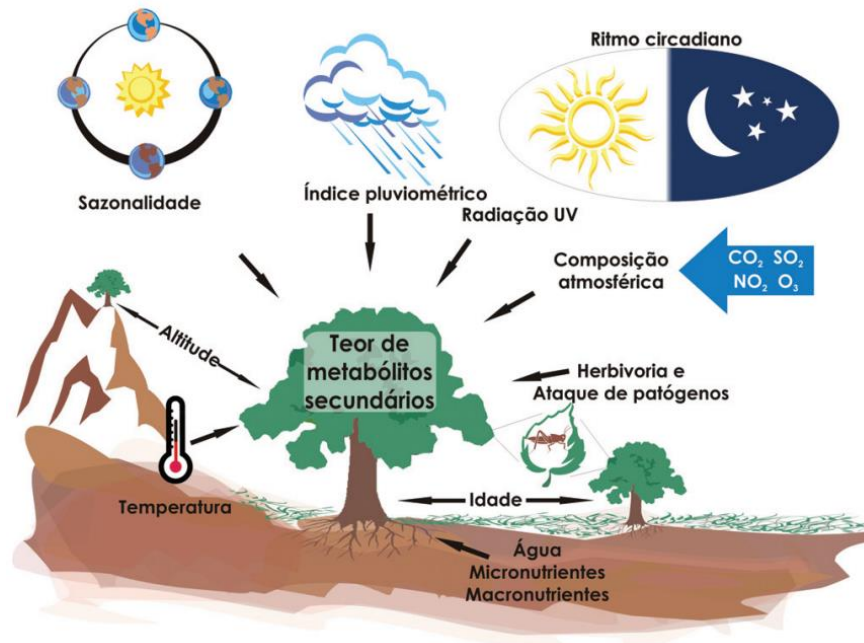
Trabalhos que estudam o metabolismo primário das plantas são importantes, pois, auxiliam na compreensão dos processos de desenvolvimento do explante/calco, uma vez que os metabólitos primários são diretamente necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas, então conhecer os níveis destes, contribui potencialmente para o conhecimento da fisiologia morfo genética (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020; PASSOS, 1996; SANTOS *et al.*, 2010).

Neste sentido, as plantas apresentam e nos oferecem um importante potencial biossintético, e ciente disso, a procura por fontes novas de produtos fitoterápicos tem aumentado (SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). A utilização das técnicas da cultura de tecidos vegetais na obtenção de metabólitos secundários, de forma eficiente e dentro de um curto período para aplicação comercial, supera os métodos convencionais, uma vez que estes demandam tempo para crescimento (CHANDRAN *et al.*, 2020), além de estarem suscetíveis a fatores edafoclimáticos. Em ambiente natural fatores climáticos, temporais ou ambientais influenciam na produção e acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (Figura 3) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



Os metabólitos secundários são produzidos de maneira controlada com baixos níveis de proteínas envolvidas, obtendo-se, então, baixo teor desses compostos nas plantas, além de dependerem de alguns fatores que regulam seu rendimento e produtividade como nutrientes apropriados e suas concentrações, fatores ambientais ou variações genéticas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002).

A biossíntese de metabólitos secundários, os quais ajudam as plantas a interagir com o ambiente biótico e abiótico, é limitada a alguns tipos de células e tecidos específicos, tornando a produção *in vitro* desses metabólitos um ótimo recurso especialmente a partir de calos, visto que é possível a obtenção de quantidade maior de material vegetal (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020; SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). Algumas vantagens da formação de metabólitos *in vitro* são a ampliação do controle da produção, utilização de linhagens que atestam uma boa qualidade, a aplicação de rotas novas de síntese advindas de linhagens mutantes, bem como também a exoneração de fatores ambientais, entre outras (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).



**Figura 4.** Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (GOBBONETO; LOPES, 2007)

Enquanto os metabólitos primários são proteínas, carboidratos e lipídios relacionados fisiologicamente ao desenvolvimento da planta, os metabólitos secundários não se apresentam de forma essencial ao ciclo de vida das plantas, mas sim de forma contributiva a sua aptidão, ocorrendo em baixas concentrações (PAGARE *et al.*, 2015). Os metabólitos secundários se dividem em três grandes grupos: terpenos, o maior agrupamento, biossintetizados a partir de acetil-coA ou de intermediários glicolíticos, que atuam como toxinas de defesa contra herbivoria, e agrupam os óleos essenciais e as saponinas; compostos fenólicos, conjunto quimicamente heterogêneo, que contém um grupamento fenol constituído de um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, os quais apresentam ação de defesa contra pragas e englobam os flavonóides, cumarinas e taninos; e alcalóides, que apresentam nitrogênio em sua estrutura e participam na defesa contra microorganismos patógenos (PAGARE *et al.*, 2015; TAIZ *et al.*, 2017).

Para o gênero de *Physalis*, já foi estudada a existência de muitas classes de metabólitos secundários (SALIM *et al.*, 2019), como esteróides (ŞAHIN, 2019), compostos fenólicos (MOREIRA *et al.*, 2020), flavonóides (ÇÖMLEKÇIOĞLU; ÖZDEN, 2019), e em especial as fisalinas que são compostos esteroidais do grupo dos terpenos bastante característicos do gênero (MASTUTI; ROSYIDAH, 2019; MASTUTI; ROSYIDAH, 2021; XU *et al.*, 2021).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

As sementes de *P. peruviana* foram obtidas de plantas cultivadas na Unidade Horto Florestal, pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana, localizada no município de Feira de Santana (12°26'86,4''S / 38°93'84,1''W). Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas em etanol 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio – NaOCl (2,5% de cloro ativo) com uma gota de detergente neutro por 10 min, e lavadas por três vezes em água destilada estéril. O cultivo foi realizado em tubo de ensaio (150 x 15 mm) com 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de PhytageI™ (meio básico) e após 30 dias as plântulas foram utilizadas como fonte de material vegetal.

### **3.2. Indução de calos sob diferentes concentrações de 2,4-D, BAP e tipos de explantes**

#### 3.2.1. Explantes foliar, cotiledonar e hipocótilo

Os explantes folha, cotilédone e hipocótilo, medindo entre 10 e 15 mm, foram inoculados em meio básico acrescido de 2,4-D nas concentrações de 0,00; 1,13; 2,26; 4,53; 9,00  $\mu\text{M}$  em combinação com BAP nas concentrações 0,00; 0,55; 1,11  $\mu\text{M}$ , de acordo com as recomendações de Yousry (2013) para *P. pubescens*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 5 x 3 (três tipos de explantes x cinco concentrações de 2,4-D x três concentrações de BAP), totalizando 45 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições com cinco amostras, sendo cada amostra constituída por um tubo de ensaio com um explante.

#### 3.2.2. Explantes nodal, internodal e hipocótilo

Os explantes hipocótilo, nodal e internodal foram inoculados em meio básico acrescido de 2,4-D nas concentrações de 0,00; 9,00; 18,00; 27,00; 36,00  $\mu\text{M}$  em combinação com BAP nas concentrações 0,00; 2,22; 4,44  $\mu\text{M}$ . O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 5 x 3 (três tipos de explantes x cinco concentrações de 2,4-D x três concentrações de BAP), totalizando 45 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições com cinco amostras, sendo cada amostra constituída por um tubo de ensaio com um explante.

#### 3.2.3. Explantes nó cotiledonar e hipocótilo

Os explantes hipocótilo e nó cotiledonar foram inoculados em meio básico acrescido com BAP nas concentrações de 0,00; 6,66; 8,88; 11,1; 13,32; 15,54  $\mu\text{M}$  em combinação com ácido 2,4-D nas concentrações de 0,00; 9,00  $\mu\text{M}$ . O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 6 x 2 (dois tipos de explante x seis concentrações de BAP x duas concentrações de 2,4-D), totalizando 24 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições com cinco amostras, sendo cada amostra constituída por um tubo de ensaio com um explante.

#### 3.2.4. Avaliações

Para os três experimentos, após 40 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos para formação de calos, o percentual da área do explante recoberta por calo (0, 25, 50, 100%), a massa fresca dos explantes com calos em miligramas, bem como a cor dos calos utilizando a cartela de cores RHS Mini Colour Chart (2005) e textura dos calos (friável e/ou compacto).

### 3.3. Condições gerais de cultivo *in vitro*

O meio de cultura teve seu pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$  e foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1,0 atm de pressão. Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana e mantidos em câmara B.O.D. ou sala de crescimento em escuro total com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Curva de Crescimento dos calos

Para determinação da curva de crescimento cinético de calos oriundos de *P. peruviana*, foi selecionado o melhor tratamento da fase anterior (item 3.2), sendo eleito o explante hipocótilo em meio básico suplementado com reguladores BAP e 2,4-D nas concentrações  $1,11\text{ }\mu\text{M}$  e  $9,00\text{ }\mu\text{M}$ , respectivamente. Os calos foram pesados em balança de precisão a partir do dia da inoculação (tempo 0), e em intervalos de sete dias, utilizando-se três repetições por período, sendo cada repetição constituída por um frasco com cinco explantes. A curva de crescimento foi plotada a partir da média das três repetições em cada tempo (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias) de determinação da massa fresca.

### 3.5. Caracterização bioquímica

As análises bioquímicas foram efetuadas no Laboratório de Germinação (LAGER), localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para preparo dos extratos foram utilizados 500 mg de calos oriundos de cada período da curva de crescimento (item 3.4), os quais foram homogeneizados em almofariz com 10 mL de

solução tampão fosfato. Essas amostras foram, então, submetidas a centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em eppendorf e armazenado em ultrafreezer para análise posterior.

Para a quantificação dos teores de proteínas solúveis, determinadas colorimetricamente pelo método de Bradford (1976), foi utilizado o soro de albumina bovina como padrão; para açúcares redutores foi utilizado o método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959), utilizando a glicose como padrão; os açúcares solúveis totais foram analisados pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), com o ácido sulfúrico como padrão; e para quantificação de  $\alpha$ -aminoácidos foi utilizado o método da Ninhidrina segundo Yemm e Coccking (1955). Para todas as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições, com três amostras cada. A leitura das absorbâncias foi realizada utilizando cuvetes de quartzo em um espectrofotômetro de feixe duplo a um comprimento de onda  $\lambda= 595$  nm para proteínas,  $\lambda= 540$  nm para açúcares redutores,  $\lambda= 620$  nm para açúcares solúveis totais e  $\lambda= 570$  nm para  $\alpha$ -aminoácidos.

### **3.6. Caracterização histológica**

A fim de acompanhar o processo de formação dos calos foi realizada a análise histológica a partir do explante inicial e em intervalos de 7 dias, seguindo a curva de calos. As amostras foram fixadas em FAA a 70% (50 ml de ácido acético glacial, 50 ml de formaldeído (a 37%) e 900 ml de álcool etílico) (KRAUS; ARDUIN, 1997) por pelo menos 72 horas e posteriormente submetidas à desidratação em série ascendente de álcool (álcool 70, 80, 90 e 100). Após a desidratação, o material foi infiltrado em solução absoluta de historesina-etanol (1:1) por 12 horas, seguida de historesina pura (Leica Microsystems) por 24 horas. Após o implante, as amostras em resina foram cortadas em micrótomo rotativo (Microm Heidelberg HM315), obtendo-se secções transversais de 10  $\mu$ m que foi então coradas com Azul de Toluidina. Os cortes histológicos foram observados em microscópio de luz Leica (DM500) equipado com uma câmera digital Leica (ICC50W), e as imagens foram analisadas no software Leica LAS EZ v. 3.4.

### 3.7. Análise da viabilidade celular

Para avaliar o perfil e a viabilidade celular dos calos foram coletadas amostras (50 mg) de calos com 49 dias de idade, obtidos a partir do explante hipocótilo em meio básico suplementado com reguladores BAP e 2,4-D nas concentrações 1,11  $\mu\text{M}$  e 9,00  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estes foram homogeneizadas com reagente CTT (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) 0,6% (p/v), preparados em solução tampão fosfato pH 7,4 conforme método utilizado por Carneiro *et al.* (2014).

### 3.8. Caracterização fitoquímica

O preparo dos extratos e posterior análise foi realizado no Laboratório de Extração (LAEX) localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para essa análise foram utilizados calos com 28 e 49 dias de idade, obtidos a partir do explante hipocótilo em meio básico suplementado com reguladores BAP e 2,4-D nas concentrações 1,11  $\mu\text{M}$  e 9,00  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os calos foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 40°C, por 2 semanas e posteriormente, triturados em almofariz com auxílio de pistilo.

O material seco, 2,7g da amostra com 49 dias e 0,8g da amostra com 28 dias, foi pesado em balança analítica e sua massa registrada para o cálculo de rendimento. Após isso, foi submerso em 20 mL de álcool metílico por 7 dias. A solução foi filtrada e concentrada por eliminação do solvente orgânico em estufa à 40°C por 24 horas, resultando nos extratos brutos metanólicos da *P. peruviana*. Após a rota de evaporação, os extratos foram pesados (0,0568g da amostra com 49 dias e 0,0165g da amostra com 28 dias) para calcular o rendimento de acordo com Rodrigues *et al.* (2011) com a seguinte fórmula:

$$Rt = (P_{ext} / P_{mat}) \times 100$$

onde: Rt = Rendimento total do extrato (%);  $P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g);  $P_{mat}$  = Peso do material seco (g).

A triagem fitoquímica foi realizada por método colorimétrico através da junção de alguns reagentes aos extratos diluídos em Hexano-Acetona (6:4). Para a identificação de compostos fenólicos foi adicionado cloreto férrico; a presença de flavonoides foi identificada pelo acréscimo

de cloreto de alumínio; para identificar alcaloides foi usado o reagente Dragendorff (Subnitrato de bismuto, ácido acético e iodeto de potássio); a metodologia para esteroides e taninos diferiu um pouco, pois constou da dissolução do extrato em clorofórmio e posterior incorporação do reagente Liebermann-Burchard (Anidrido acético e ácido sulfúrico); já a procura por cumarinas foi realizada por cromatografia em camada delgada, seguido da absorção de NaOH (hidróxido de sódio) e posterior exposição à luz ultravioleta.

### **3.9. Análise estatística**

Os dados testados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando o software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2019).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Indução de calos em *Physalis peruviana***

#### **4.1.1. Explantes foliar, cotiledonar e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP**

Observou-se a existência de interação tripla (TE x 2,4-D x BAP) significativa ( $p \leq 0,05$ ) em todas as variáveis analisadas (Tabela 1). Para a variável porcentagem de explante responsivo à formação de calos, a interação tripla está representada pela taxa de 100% no explante hipocótilo sob a concentração de 1,11  $\mu\text{M}$  da citocinina BAP combinada a 2,26  $\mu\text{M}$  da auxina 2,4-D (Tabela 2). Vale salientar que o aumento das concentrações desta auxina manteve a taxa máxima de responsividade dos explantes. Isso se deve a capacidade desse regulador vegetal em modular a morfogênese e promover a formação de calo, principalmente quando combinado a uma citocinina.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (folha, cotilédone ou hipocótilo).

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		Explante responsivo	Massa fresca	Área recoberta por calo
TE	2	10597,33*	105044,18*	24204,00*
2,4-D	4	27140,44*	356947,95*	13559,27*
BAP	2	20229,33*	546613,15*	11667,00*
TE x 2,4-D	8	3028,44*	51690,00*	2525,52*
TE x BAP	4	698,66 <sup>ns</sup>	846,60 <sup>ns</sup>	1652,00*
2,4-D x BAP	8	1833,77*	73893,30*	1507,27*
TE x 2,4-D x BAP	16	1319,77*	24347,73*	521,02*
Resíduo		657,77	8483,31	240,77
CV (%)		35,75	49,01	40,98

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Médias percentuais (%) de explantes responsivos a partir de três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.

BAP (µM)	2,4-D (µM)				
	0,00	1,13	2,26	4,53	9,00
<b>Cotilédone</b>					
0,00	0 Bc <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	80 Aab <sup>a</sup>	72 Aab <sup>a</sup>	56 Bb <sup>a</sup>
0,55	84 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>
1,11	68 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>
<b>Folha</b>					
0,00	0 Bc <sup>a</sup>	76 Aa <sup>a</sup>	72 Aab <sup>a</sup>	20 Bc <sup>b</sup>	24 Bbc <sup>a</sup>
0,55	36 Ab <sup>b</sup>	92 Aa <sup>a</sup>	76 Aab <sup>a</sup>	60 Aab <sup>b</sup>	80 Aab <sup>a</sup>
1,11	72 Aa <sup>a</sup>	76 Aa <sup>a</sup>	60 Aa <sup>b</sup>	80 Aa <sup>a</sup>	80 Aa <sup>a</sup>
<b>Hipocótilo</b>					
0,00	0 Ac <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	48 Bb <sup>a</sup>	76 Aab <sup>a</sup>	68 Aab <sup>a</sup>
0,55	4 Ab <sup>b</sup>	96 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	76 Aa <sup>ab</sup>	100 Aa <sup>a</sup>
1,11	0 Ab <sup>b</sup>	96 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>

Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e são comparadas entre os tipos de explantes.



A combinação de BAP e 2,4-D para formação de calos foi reportada por Yousry (2013) para indução de embriões somáticos em *P. pubescens*. Os resultados da autora demonstraram que as interações entre 1,13  $\mu\text{M}$ , 2,26  $\mu\text{M}$  e 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP no explante foliar apresentaram maior valor médio, além de serem 100% pró-embriônicos, resultado que contrapõe o do presente trabalho que aponta o hipocótilo como explante de maior valor médio para a formação de calos.

As variáveis massa fresca e área recoberta por calo apresentaram interação tripla e suas maiores médias (591,68 mg de massa fresca e 100% de área recoberta por calo) foram obtidas também no explante hipocótilo sob efeito de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP associado a 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Média da massa fresca em miligramas em três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )				
	0,00	1,13	2,26	4,53	9,00
<b>Cotilédone</b>					
<b>0,00</b>	0,00 Ac <sup>a</sup>	87,56 Bbc <sup>a</sup>	293,11 Aa <sup>a</sup>	173,25 Bab <sup>a</sup>	94,88 Bbc <sup>a</sup>
<b>0,55</b>	86,3 Ab <sup>a</sup>	376,22 Aa <sup>a</sup>	302,54 Aa <sup>a</sup>	342,99 Aa <sup>a</sup>	283,74 Aa <sup>a</sup>
<b>1,11</b>	60,84 Ab <sup>a</sup>	330,28 Aa <sup>a</sup>	301,14 Aa <sup>a</sup>	403,69 Aa <sup>a</sup>	327,34 Aa <sup>b</sup>
<b>Folha</b>					
<b>0,00</b>	0,00 Aa <sup>a</sup>	123,78 Aa <sup>a</sup>	132,94 Aa <sup>b</sup>	36,84 Ba <sup>a</sup>	33,82 Ba <sup>a</sup>
<b>0,55</b>	81,38 Ab <sup>a</sup>	245,96 Aa <sup>ab</sup>	207,05 Aab <sup>a</sup>	172,72 Bab <sup>a</sup>	280,44 Aa <sup>a</sup>
<b>1,11</b>	91,65 Ac <sup>a</sup>	207,25Aabc <sup>ab</sup>	173,20 Abc <sup>a</sup>	335,91 Aa <sup>a</sup>	317,06 Aab <sup>b</sup>
<b>Hipocótilo</b>					
<b>0,00</b>	0,00 Aa <sup>a</sup>	159,84 Aa <sup>a</sup>	85,34 Aa <sup>b</sup>	88,19 Ba <sup>a</sup>	37,45 Ca <sup>a</sup>
<b>0,55</b>	0,58 Ad <sup>a</sup>	153,61 Acd <sup>b</sup>	174,1 Abc <sup>a</sup>	328,24 Aab <sup>a</sup>	397,35 Ba <sup>a</sup>
<b>1,11</b>	0,00 Ad <sup>a</sup>	100,2 Acd <sup>b</sup>	170,26 Abc <sup>a</sup>	266,18 Ab <sup>a</sup>	591,68 Aa <sup>a</sup>

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e são comparadas entre os tipos de explantes.

Tabela 4. Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de três tipos de explantes (cotilédone, folha e hipocótilo) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

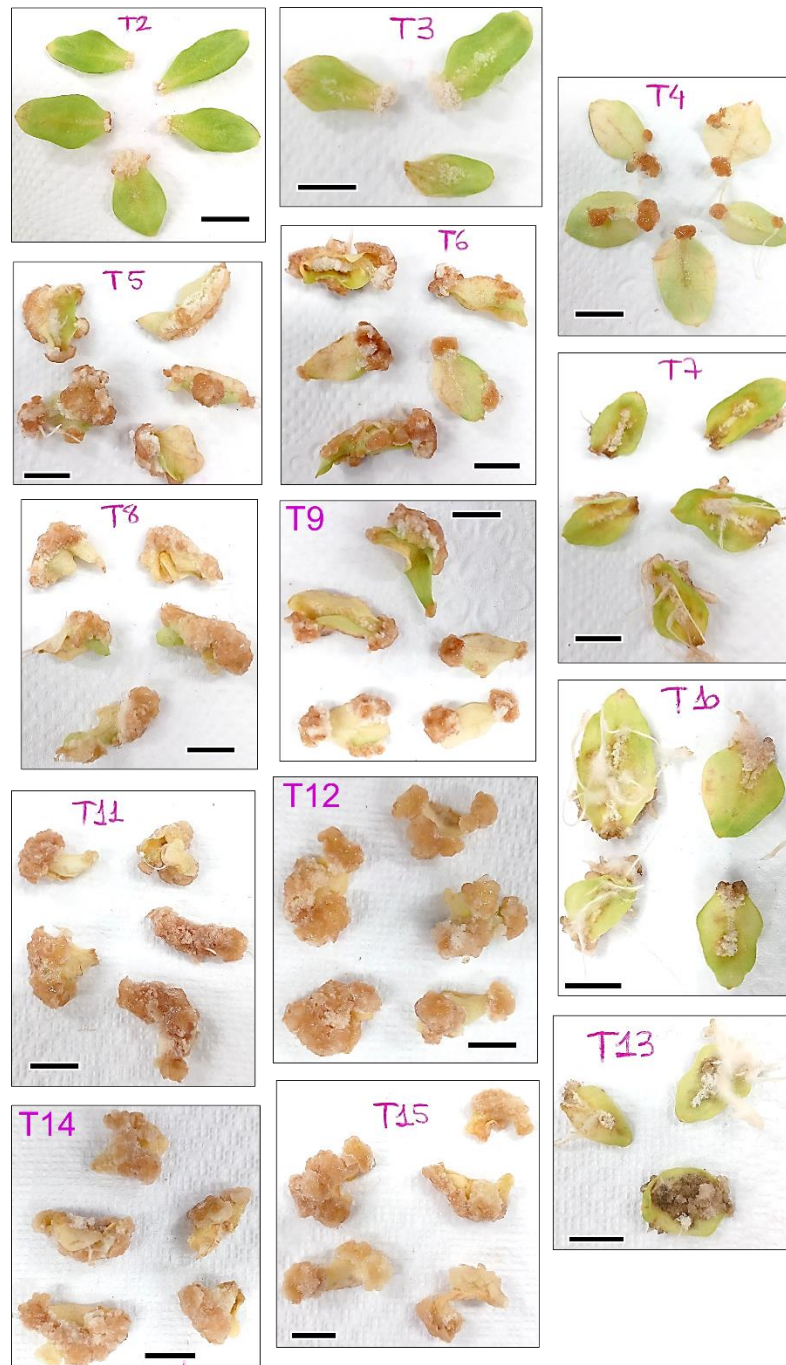
BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )				
	0,00	1,13	2,26	4,53	9,00
<b>Cotilédone</b>					
0,00	0 Bb <sup>a</sup>	25 Aa <sup>b</sup>	20 Ba <sup>a</sup>	18 Ba <sup>b</sup>	15 Bab <sup>a</sup>
0,55	21 Ab <sup>a</sup>	53 Aab <sup>ab</sup>	57 Aab <sup>a</sup>	72 Aa <sup>a</sup>	70 Aa <sup>b</sup>
1,11	17 Ab <sup>a</sup>	52 Aab <sup>a</sup>	53 Aab <sup>a</sup>	73 Aa <sup>a</sup>	64 Aa <sup>b</sup>
<b>Folha</b>					
0,00	0 Bb <sup>a</sup>	19 Aa <sup>b</sup>	18 Aa <sup>a</sup>	5 Bab <sup>b</sup>	6 Aab <sup>a</sup>
0,55	9 Aba <sup>ab</sup>	28 Aa <sup>b</sup>	24 Aa <sup>b</sup>	22 Aba <sup>b</sup>	26 Aa <sup>c</sup>
1,11	18 Aa <sup>a</sup>	22 Aa <sup>b</sup>	20 Aa <sup>b</sup>	32 Aa <sup>b</sup>	31 Aa <sup>c</sup>
<b>Hipocótilo</b>					
0,00	0 Ac <sup>a</sup>	80 Aa <sup>a</sup>	48 Aab <sup>a</sup>	69 Aa <sup>a</sup>	29 Bb <sup>a</sup>
0,55	1 Ac <sup>b</sup>	65 Ab <sup>a</sup>	66 Ab <sup>a</sup>	71 Aab <sup>a</sup>	94 Aa <sup>a</sup>
1,11	0 Ac <sup>b</sup>	51 Ab <sup>a</sup>	64 Ab <sup>a</sup>	76 Ab <sup>a</sup>	100 Aa <sup>a</sup>

Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e são comparadas entre os tipos de explantes.

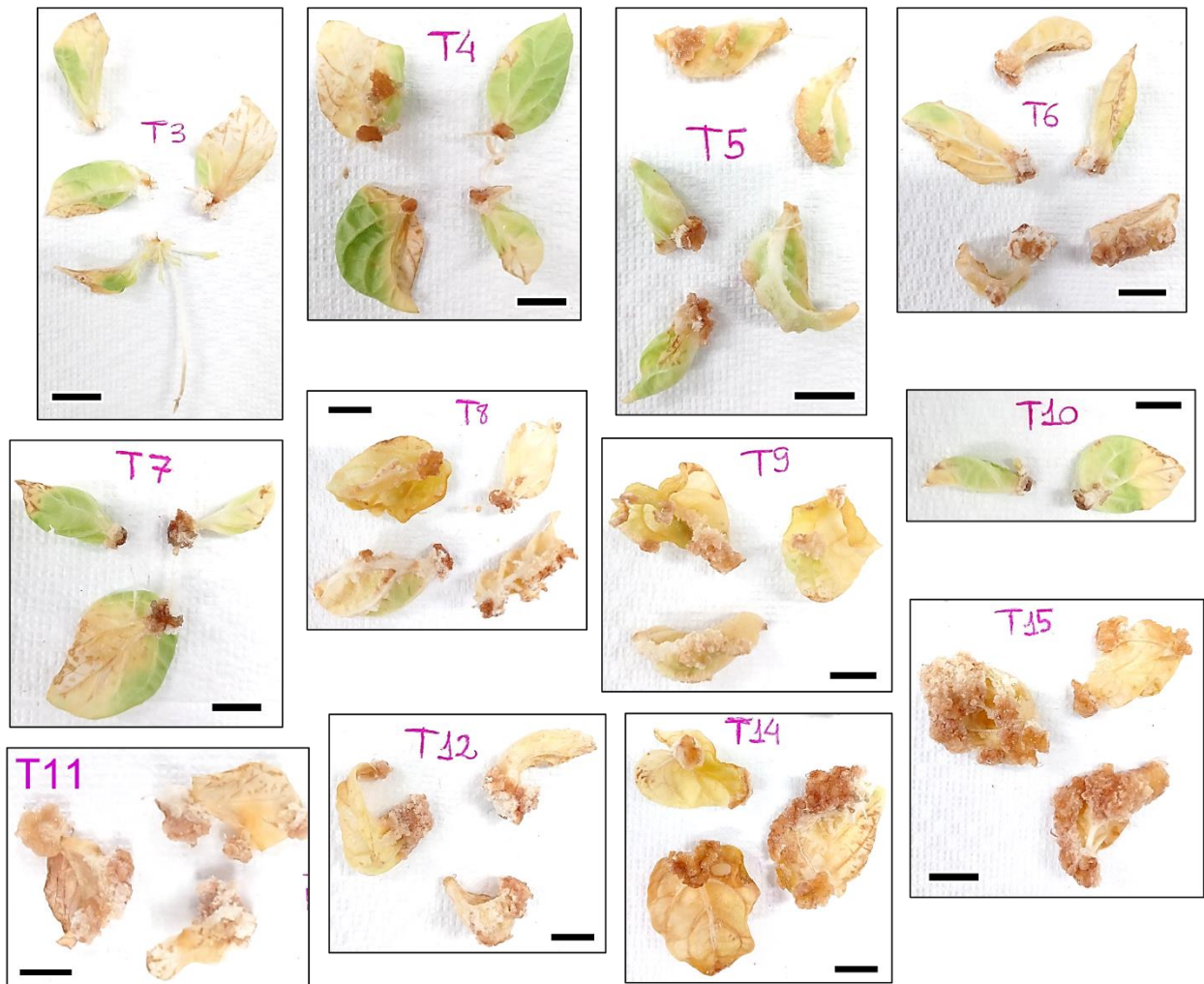
Como observado no presente estudo, para a formação de calo o explante hipocótilo apresentou melhores respostas quando comparado ao cotilédone e a folha. Isso provavelmente se deve à presença de mais células meristemáticas quando comparado com os outros explantes. Este resultado corrobora Alvarado *et al.* (2021), que também apontaram o explante hipocótilo como melhor resultado para formação de calos de *P. ixocarpa* sob efeito de BAP e ANA (ácido naftalenacético) em combinação; porém difere dos resultados apresentados por Mascarenhas, Santana e Lima-Brito (2019) que relatam que o explante foliar de *P. peruviana* em meio suplementado com BAP é mais eficiente para indução de calogênese.

Morfologicamente, os calos gerados apresentaram, em sua maioria, textura compacta concomitante à friável na maioria dos tratamentos, porém, mais especificamente, tratamentos contendo altas taxas dos reguladores combinados ou somente um dos reguladores vegetais apresentaram calos majoritariamente friáveis. De acordo com a cartela de cores RHS Mini Colour Chart (2005), as colorações mais recorrentes foram pelo código N167A, caracterizada por marrom,

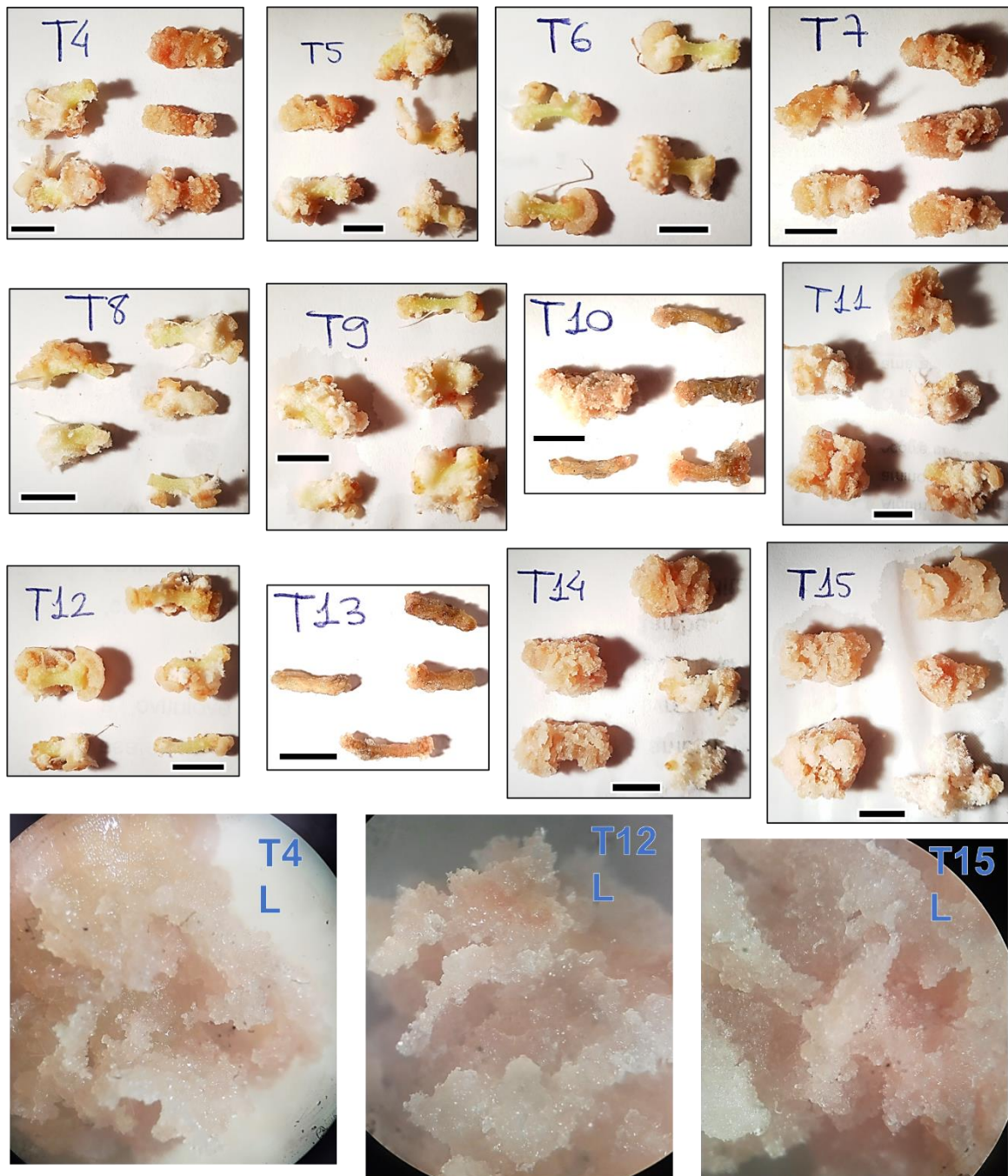
e pelo código 199C caracterizado por bege, sempre com regiões esbranquiçadas. Nos três explantes também foi bem recorrente a presença de calos brancos (Figuras 5, 6 e 7). Foi possível observar a correlação de calos esbranquiçados em tratamentos com combinação entre auxina e citocinina e calos totalmente amarronzados em tratamentos apenas com auxina como regulador. Para o tratamento contendo 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP e 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D no explante hipocótilo foi observado textura friável e coloração bege esbranquiçado, caracterizada pelo código 168D, na maioria dos calos. Também foi observada a presença de estruturas globulares em alguns calos desse mesmo tratamento. As texturas e cores dos calos gerados no presente trabalho corroboram a morfologia encontrada por Mascarenhas, Santana e Lima-Brito (2019) nos calos de *P. peruviana*.



**Figura 5.** Calos gerados do explante cotilédone aos 40 dias de idade. T2 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T3 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T4 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T5 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T6 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T7 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T13 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T14 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T15 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. O tratamento controle T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontra presente pois não gerou calos. Barra = 1 cm.



**Figura 6.** Calos gerados do explante folha aos 40 dias de idade. T3 = 0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T4 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T5 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T6 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T7 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T14 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T15 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP) e T13 (9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.



**Figura 7.** Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T4 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T5 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T6 = 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T7 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T13 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T14 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP, T15 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, T4L, T12L e T15L= Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T4, T12 e T15, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP) e T3 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.

#### 4.1.2. Explantes nodal, internodal e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP

Pela tabela de análise de variância foi possível observar interação tripla (TE x 2,4-D x BAP) significativa ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis explante responsivo e área recoberta por calo, e interação dupla (2,4-D x BAP) significativa para massa fresca dos calos de *P. peruviana* (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (segmentos nodal, intermodal e hipocótilo).

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		Explante responsivo	Massa fresca	Área recoberta por calo
TE	2	882,22 <sup>ns</sup>	51488,45*	1965,37*
2,4-D	4	28094,44*	445818,27*	31554,60*
BAP	2	4602,22*	1345158,03*	9998,72*
TE x 2,4-D	8	804,44 <sup>ns</sup>	10560,99 <sup>ns</sup>	809,93 <sup>ns</sup>
TE x BAP	4	495,55 <sup>ns</sup>	17713,62 <sup>ns</sup>	2693,98*
2,4-D x BAP	8	4982,77*	123912,70*	3083,92*
TE x 2,4-D x BAP	16	1155,27*	9136,01 <sup>ns</sup>	1215,26*
Resíduo		620,74	8916,25	492,42
CV (%)		34,50	44,65	32,58

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável explantes responsivos foram obtidas altas taxas nos três tipos de explantes, especialmente na combinação dos reguladores vegetais (Tabela 6). É possível observar também que na ausência de auxina a taxa de formação de calo é menor em comparação quando há uma combinação dos dois tipos de reguladores, demonstrando então a grande importância da combinação entre auxina e citocinina para melhor formação dos calos. Oliveira *et al.* (2019) ratifica essa ideia quando descreve que as maiores taxas de formação de calos de *P. angulata* foram encontradas no meio de cultura com adição da auxina 2,4-D e as menores taxas encontradas no meio somente com citocininas, BAP ou Cinetina.

Tabela 6. Médias percentuais (%) de explantes responsivos a partir de três tipos de explantes (hipocótilo, segmento nodal e internodal) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )				
	0,0	9,0	18,0	27,0	36,0
<b>Hipocótilo</b>					
<b>0,00</b>	65 Aab	75 Aa	75 Bab	50 Bab	20 Bb
<b>2,22</b>	0 Bb	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
<b>4,44</b>	35 Abb	100 Aa*	75 Aba	100 Aa	90 Aa
<b>Segmento Internodal</b>					
<b>0,00</b>	50 Ab	100 Aa	60 Bab	60 Bb	45 Bb
<b>2,22</b>	10 Ab	75 Aba	100 Aa	100 Aa	75 Aa
<b>4,44</b>	0 Ac	50 Bb	100 Aa	100 Aa	100 Aa
<b>Segmento Nodal</b>					
<b>0,00</b>	20 Ac	100 Aa	75 Aab	95 Aa*	45 Bbc
<b>2,22</b>	25 Ab	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
<b>4,44</b>	5 Ab	100 Aa*	75 Aa	100 Aa	100 Aa

Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. \* Tratamento mais significativo comparado entre os explantes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para a variável área do explante recoberta por calo foram obtidas as maiores médias de 100% nos três explantes testados: hipocótilo (4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D), segmento internodal (4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 18  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) e segmento nodal (2,22  $\mu\text{M}$  de BAP e 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) (Tabela 7). É possível perceber médias máximas em muitos dos tratamentos contendo auxina, porém é interessante a utilização de concentrações baixas visando o menor custo, uma vez que estas também apresentam bons resultados (100%). Para a variável massa fresca dos calos, houve apenas interação dupla significativa entre os reguladores, assim foi possível observar a maior média de 515,79 mg de calos inoculados em meio com 18  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (Tabela 8).



Tabela 7. Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de três tipos de explantes (hipocótilo e segmentos internodal e nodal) de *Physalis peruviana* cultivados in vitro em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )				
	0,0	9,0	18,0	27,0	36,0
<b>Hipocótilo</b>					
<b>0,00</b>	35,41 Aa <sup>a</sup>	52,5 Ba <sup>b</sup>	37,5 Ca <sup>b</sup>	17,5 Ba <sup>b</sup>	28,12 Ba <sup>a</sup>
<b>2,22</b>	0,0 Ab <sup>a</sup>	85,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>
<b>4,44</b>	25,0 Ab <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	71,25 Ba <sup>b</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	98,43 Aa <sup>a</sup>
<b>Segmento Internodal</b>					
<b>0,00</b>	21,87 Ab <sup>a</sup>	97,5 Aa <sup>a</sup>	53,75 Bb <sup>ab</sup>	64,37 Bb <sup>a</sup>	75,0 Aab <sup>a</sup>
<b>2,22</b>	12,5 Ab <sup>a</sup>	75,0 Aa <sup>a</sup>	95,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	75,0 Aa <sup>a</sup>
<b>4,44</b>	0,0 Ab <sup>a</sup>	37,5 Bb <sup>b</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	98,75 Aa <sup>a</sup>	91,25 Aa <sup>a</sup>
<b>Segmento Nodal</b>					
<b>0,00</b>	15,62 Ac <sup>a</sup>	97,5 Aa <sup>a</sup>	72,5 Aab <sup>a</sup>	86,87 Aab <sup>a</sup>	45,31 Bbc <sup>a</sup>
<b>2,22</b>	21,87 Ab <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>
<b>4,44</b>	6,25 Ab <sup>a</sup>	97,5 Aa <sup>a</sup>	75,0 Aa <sup>ab</sup>	100,0 Aa <sup>a</sup>	98,75 Aa <sup>a</sup>

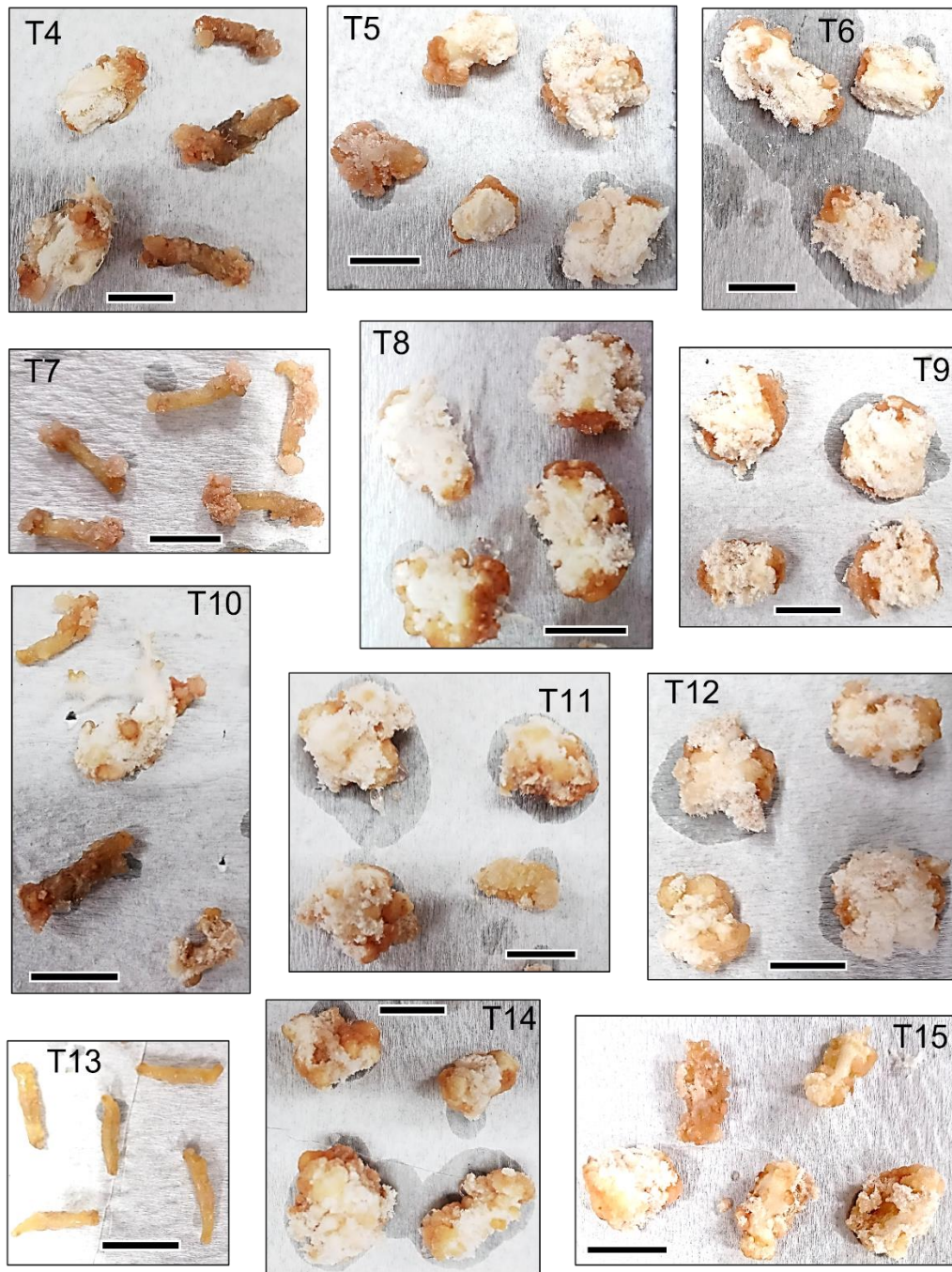
Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e são comparadas entre os tipos de explantes.

Tabela 8. Média geral da massa fresca em miligramas em três tipos de explantes (hipocótilo e segmentos nodal e internodal) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

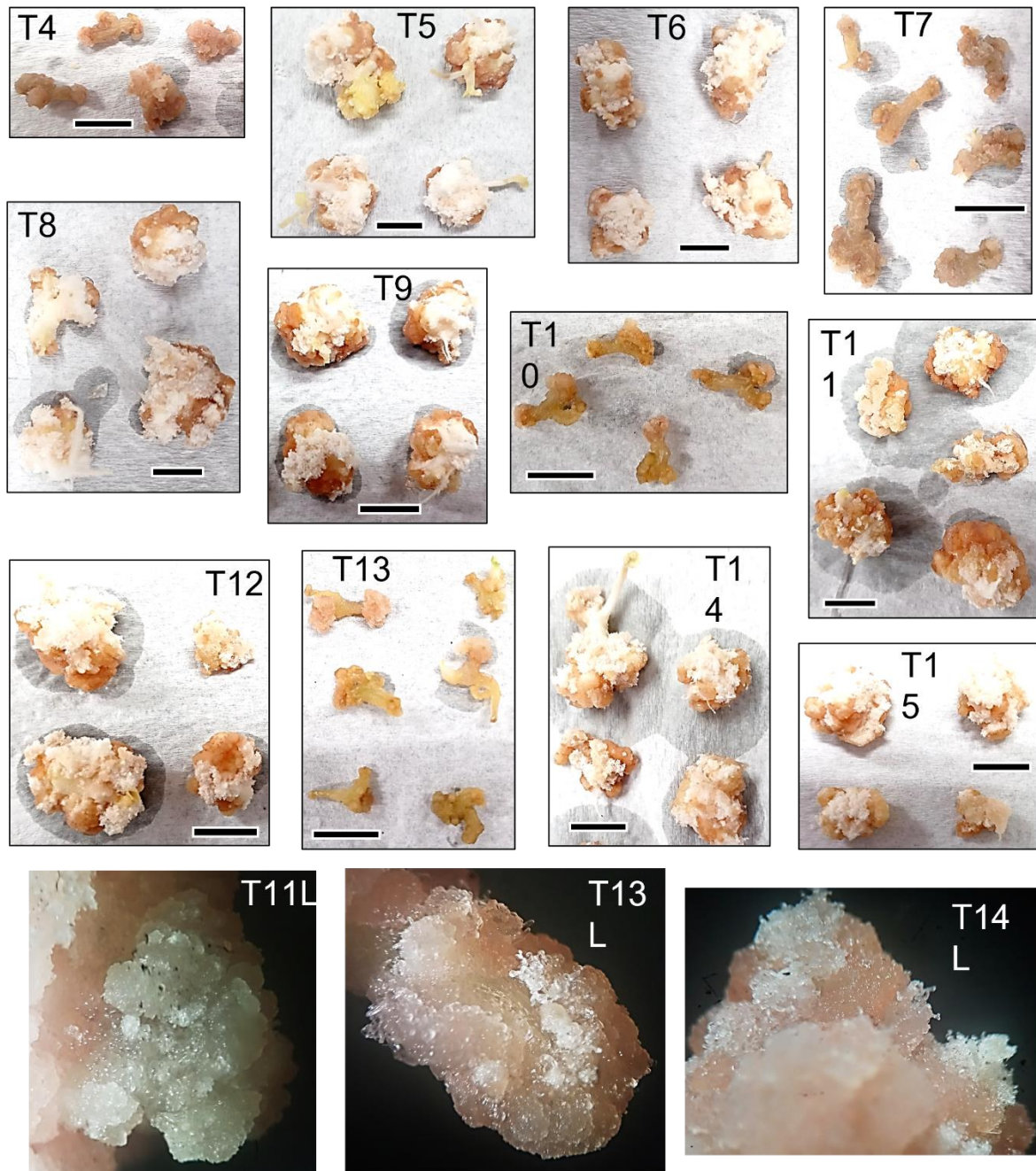
BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )				
	0,0	9,0	18,0	27,0	36,0
<b>0,00</b>	32,03 Aa	94,6 Ca	48,35 Ca	63,93 Ca	33,22 Ca
<b>2,22</b>	23,91 Ac	305,16 Ab	515,79 Aa	469,2 Aa	449 Aa
<b>4,44</b>	18,43 Ac	211,06 Bb	305,51 Bab	363,62 Ba	238,53 Bb

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

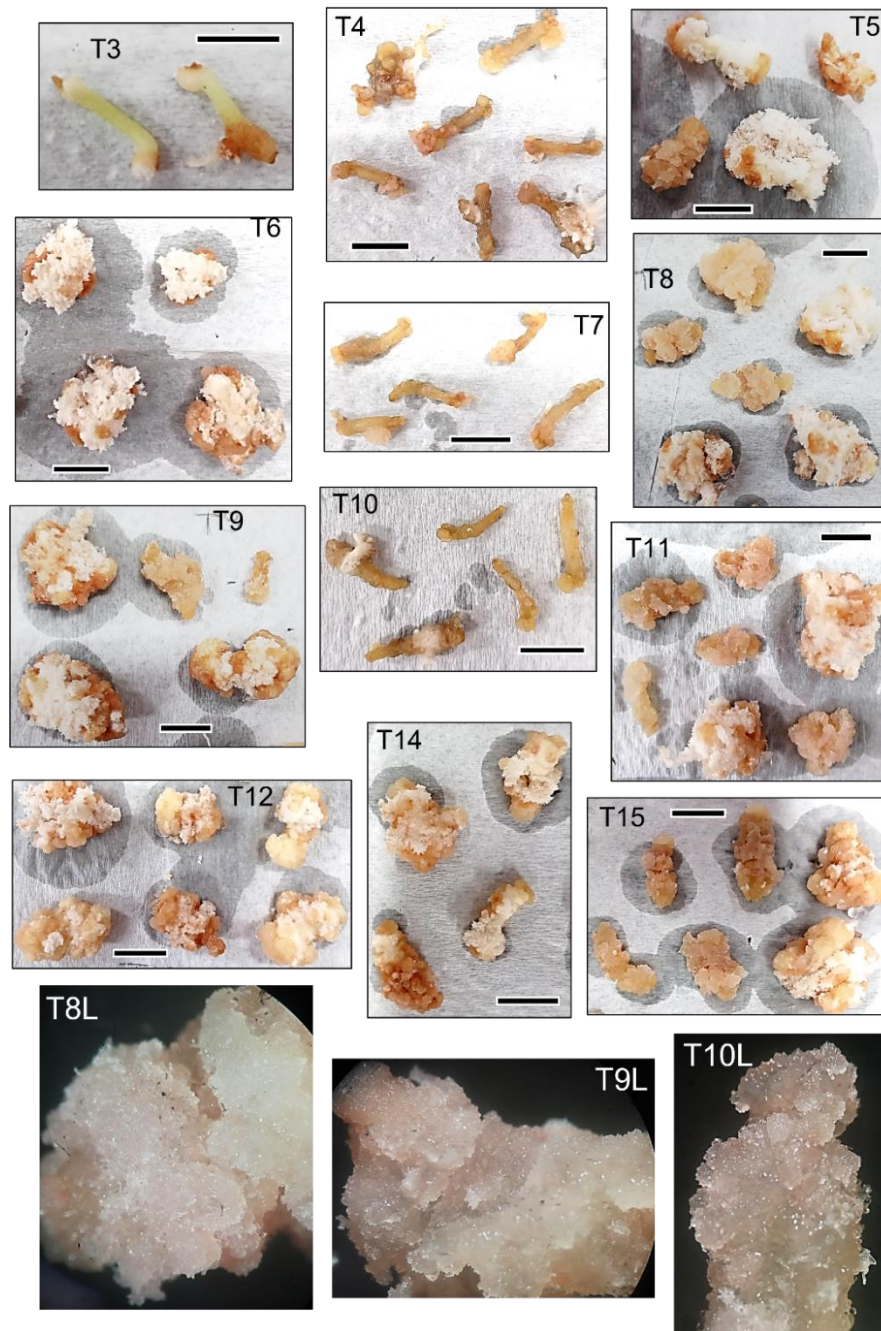
Os calos desse experimento apresentaram textura compacta e friável simultaneamente na maioria dos tratamentos, exceto nos tratamentos contendo apenas a auxina 2,4-D, estes apresentaram calos apenas friáveis. Segundo a cartela de cores RHS Mini Colour Chart (2005), as colorações mais recorrentes dos calos analisados provenientes do explante hipocótilo e segmento nodal foram pelo código 199A caracterizada por uma tonalidade de marrom/bege e pelo código 158A caracterizado por uma tonalidade de branco, quase sempre misturadas no mesmo calo. Também foi notada presença de estruturas globulares em alguns calos desses explantes. Na maioria dos calos do explante segmento internodal, de acordo com a cartela de cores, foi possível observar as colorações de marrom e branco, caracterizadas pelo código N167A e 158A, respectivamente (Figuras 8, 9 e 10).



**Figura 8.** Calos gerados do explante segmento internodal aos 40 dias idade. T4 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T5 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T6 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T7 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T8 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T9 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T10 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T11 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T12 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T13 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T14 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T15 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP), T2 (0  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP) e T3 (0  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.



**Figura 9.** Calos gerados do explante segmento nodal aos 40 dias de idade. T4 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T5 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T6 = 9  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T7 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T8 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T9 = 18  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T10 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T11 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T12 = 27  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, T13 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP, T14 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP, T15 = 36  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP, 11L, T13L e T14L = Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T11, T13 e T14, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu$ M 2,4-D e 0  $\mu$ M BAP), T2 (0  $\mu$ M 2,4-D e 2,22  $\mu$ M BAP) e T3 (0  $\mu$ M 2,4-D e 4,44  $\mu$ M BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.



**Figura 10.** Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T3 = 0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T4 = 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T5 = 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T6 = 9  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T7 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T8 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T9 = 18  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T10 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP, T11 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T12 = 27  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T14 = 36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP, T15 = 36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, T8L, T9L e T10L = Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T8, T9 e T10, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,22  $\mu\text{M}$  BAP) e T13 (36  $\mu\text{M}$  2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.

#### 4.1.3. Explantes nó cotiledonar e hipocótilo sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP

De acordo com a tabela de análise de variância, houve interação dupla (2,4-D x BAP) nas variáveis explante responsivo e massa fresca (Tabela 9). Já para a variável área recoberta por calo houve interação tripla (TE x 2,4-D x BAP) significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 9. Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo, massa fresca e área recoberta por calo. TE= tipo de explante (nó cotiledonar e hipocótilo).

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		Explante responsivo	Massa fresca	Área recoberta por calo
TE	1	83,33 <sup>ns</sup>	308122,24*	1300,20*
2,4-D	1	286163,33*	1911566,56*	259935,20*
BAP	5	83,33*	10846,64*	68,20*
TE x 2,4-D	1	83,33 <sup>ns</sup>	287669,37 <sup>ns</sup>	935,20*
TE x BAP	5	35,33 <sup>ns</sup>	3360,12 <sup>ns</sup>	133,20*
2,4-D x BAP	5	83,33*	13038,37*	162,20*
TE x 2,4-D x BAP	5	35,33 <sup>ns</sup>	3356,41 <sup>ns</sup>	68,20*
Resíduo		28,33	2406,05	8,43
CV (%)		10,40	38,30	6,15

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

É possível analisar na variável explantes responsivos e em todas as outras a importância da presença de auxina no meio de cultura, uma vez que em sua presença houve taxas altas tanto de calos formados (Tabela 10), quanto de peso de massa fresca, bem como de área dos explantes recoberta por calo, enquanto na ausência do regulador 2,4-D as médias reduziram de forma acentuada.

Na variável massa fresca é possível identificar um aumento no peso dos calos sob suplementação de 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP (327,68 mg) quando comparado ao tratamento na ausência de BAP (221,27 mg), ambos na presença de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 11), considerando, então, importante a presença do BAP no meio de cultura, uma vez que promoveu esse incremento.

Tabela 10. Médias percentuais (%) da variável explantes responsivos de dois tipos de explantes (nó cotiledonar e hipocótilo) *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )					
	0,00	6,66	8,88	11,10	13,32	15,54
0,0	0 Bb	0 Bb	0 Bb	0 Bb	4 Bab	10 Ba
9,0	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa

Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 11. Média geral da massa fresca em miligramas de calos de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )					
	0,00	6,66	8,88	11,10	13,32	15,54
0,0	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	3,64 Ba	7,44 Ba
9,0	221,27Abc	327,68Aa	274,86Aab	276,15Aab	236,07Abc	189,60Ac

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Pela variável área do explante recoberta por calo consegue-se observar uma superioridade estatística por parte do explante nó cotiledonar, uma vez que este apresentou melhores taxas quando comparado ao hipocótilo. É possível perceber isso, pelo fato de que o maior resultado de hipocótilo (98%) em presença de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP não supera o menor resultado obtido pelo nó cotiledonar (99%) em presença de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP (Tabela 12).

Estes resultados corroboram Mascarenhas, Santana e Lima-Brito (2019) uma vez que também relataram o nó cotiledonar de *P. peruviana* como explante com alta eficiência para a variável porcentagem de explantes responsivos, porém diferem destes autores em relação à área do explante recoberta por calo já que obtiveram porcentagem de 37,5%, inferior à registrada no presente estudo que foi de 100%. Além disso, estes autores obtiveram 100% de explantes com calo com uso isolado de baixa concentração de BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) contrapondo os resultados desta pesquisa, na qual a utilização isolada desta citocinina só apresentou resposta em concentração superior (13,32  $\mu\text{M}$ ), e a porcentagem de 100% foi registrada na presença da auxina 2,4-D isolada ou combinada com BAP.

Tabela 12. Médias percentuais (%) de área do explante recoberta por calo de dois explantes (hipocótilo e nó cotiledonar) de *Physalis peruviana* cultivados em combinação de BAP e 2,4-D

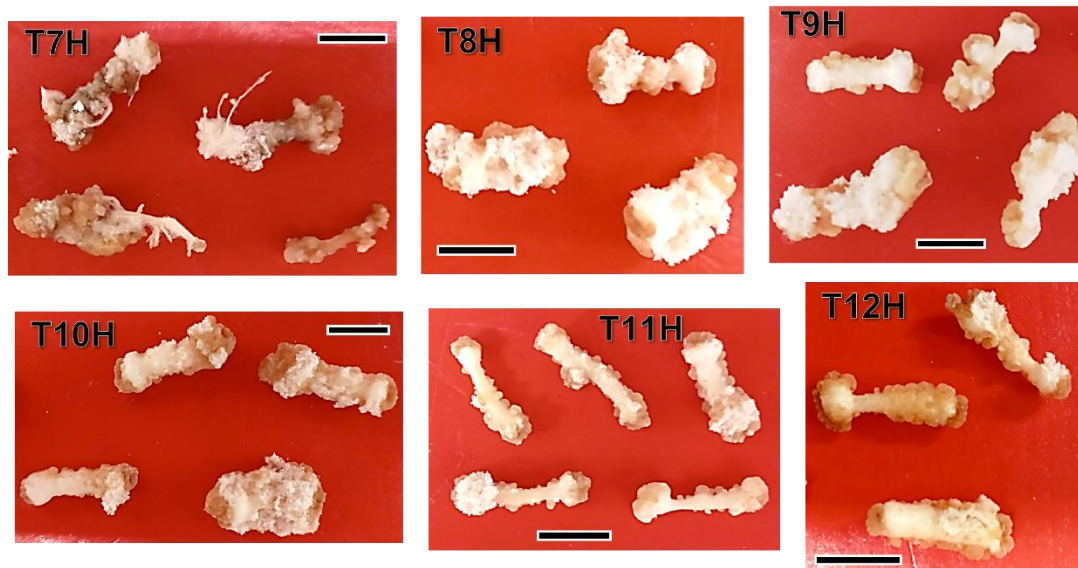
2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )					
	0,00	6,66	8,88	11,10	13,32	15,54
<b>Hipocótilo</b>						
0,0	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	1 Ba
9,0	98 Aa	94 Aab	91 Ab	90 Ab	77 Ac	76 Ac
<b>Nó cotiledonar</b>						
0,0	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	3 Ba	4 Ba
9,0	100 Aa*	100 Aa*	100 Aa*	100 Aa*	100 Aa*	99 Aa*

Teste de Tukey realizado com média transformada em arcosseno. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. \* Tratamento mais significativo comparado entre os explantes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

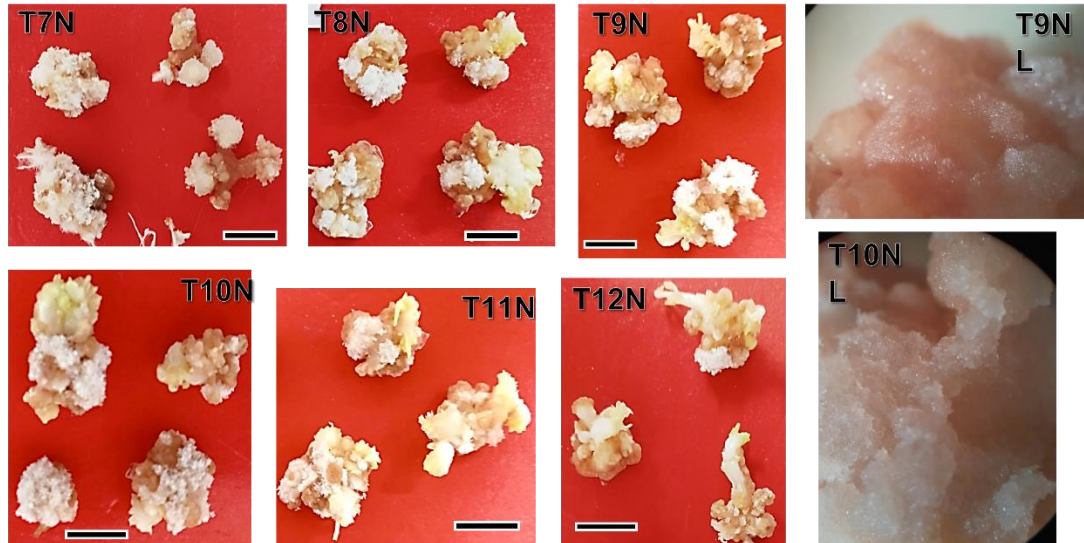
De acordo com Taiz *et al.* (2017), a produção de calos depende do balanço hormonal entre auxinas e citocininas presentes no meio de cultura, que em níveis intermediários ou relativamente maior para auxina, promove a proliferação de células indiferenciadas. Além disso, partes novas da planta ou imaturas apresentam melhor capacidade regenerativa, pois apresentam células ainda pouco diferenciadas e meristemáticas.

Os calos obtidos apresentaram textura compacta e friável ao mesmo tempo na maioria dos tratamentos (Figuras 11 e 12), exceto os tratamentos contendo as maiores concentrações de reguladores (9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP), que apresentaram calos apenas compactos. Segundo a cartela de cores RHS Mini Colour Chart (2005), as colorações mais recorrentes dos calos analisados provenientes do explante hipocótilo foram pelo código N167A caracterizada por uma tonalidade de marrom e pelo código 155B caracterizado por uma tonalidade de branco, quase sempre misturadas no mesmo calo. Na maioria dos calos do explante nó cotiledonar, foi possível observar as mesmas tonalidades de marrom e branco, juntamente com uma tonalidade de verde caracterizada pelo código 2D na cartela de cores. O explante nó cotiledonar também apresentou formação de brotos em muitos dos explantes, principalmente naqueles com as menores concentrações de reguladores. Também foi notada presença de estruturas globulares em alguns calos desse mesmo explante (Figura 12).





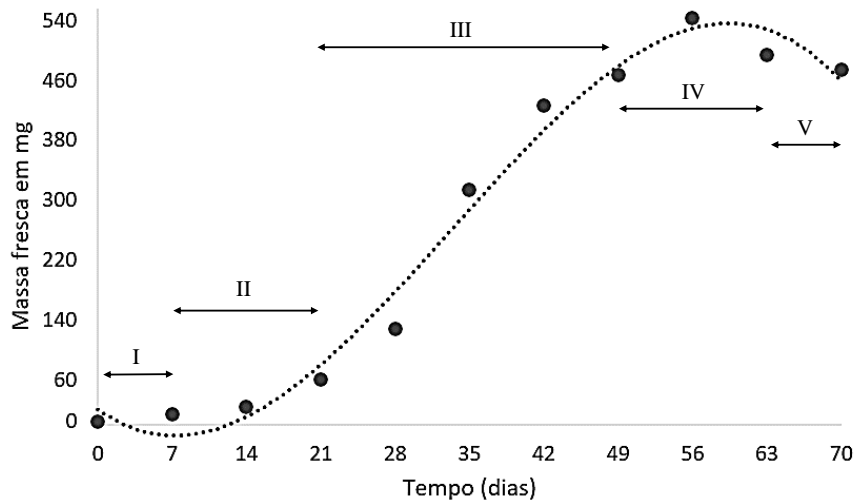
**Figura 11.** Calos gerados do explante hipocótilo aos 40 dias de idade. T7 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP), T3 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP), T4 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP), T5 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP) e T6 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.



**Figura 12.** Calos gerados do explante nó cotiledonar aos 40 dias de idade. T7 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP, T8 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, T9 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, T10 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, T11 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP, T12 = 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP, T9L e T10L = Vista na lupa de algumas estruturas globulares do tratamento T9 e T10, respectivamente. Os tratamentos T1 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0  $\mu\text{M}$  de BAP), T2 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP), T3 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP), T4 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP), T5 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP) e T6 (0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15,54  $\mu\text{M}$  de BAP) não se encontram presentes pois não geraram calos. Barra = 1 cm.

## 4.2. Curva de crescimento de calos de *Physalis peruviana*

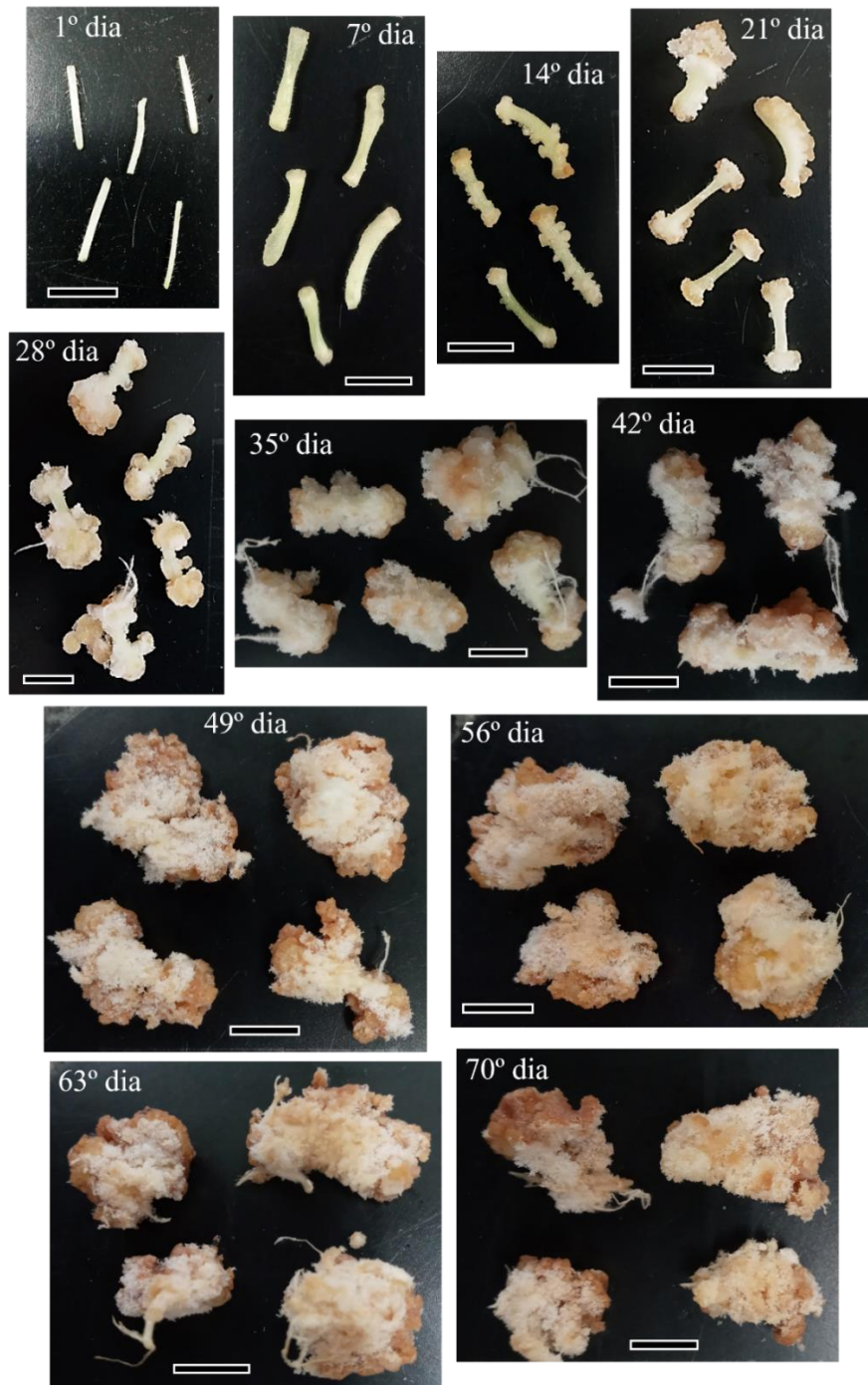
Para a espécie *P. peruviana*, a curva de crescimento de calos foi efetivada durante 70 dias de cultivo in vitro, e durante esse período foram observadas 5 fases (Figura 13).



**Figura 13.** Curva de crescimento de calos de *Physalis peruviana* obtidos a partir de explantes de hipocótilo inoculados em meio de cultura suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Fase I= Lag, II = exponencial, III = linear, IV = desaceleração, V = declínio.

A primeira fase da curva, denominada de lag, foi observada até o 7º dia de cultivo, e é caracterizada pela preparação das células para a divisão celular com mobilização e síntese de metabólitos, além de corresponder à interfase do ciclo celular (BERTONCELLI *et al.*, 2014). A segunda fase foi a exponencial, observada entre o 7º e o 21º dia, na qual ocorre a máxima divisão celular (fase mitótica do ciclo), e segundo Lima *et al.* (2007) pode ser caracterizada como uma fase produtora de compostos químicos complexos, como proteínas e ácidos nucleicos. A fase linear começou a partir do 21º dia e terminou no 49º dia, e, de acordo com Feitosa (2013), se caracteriza pela diminuição da divisão celular e aumento da área celular, sendo possível observar morfologicamente na Figura 14. A fase seguinte foi a de desaceleração que durou 14 dias (49º ao 63º dia), sendo uma fase de grande importância pois, conforme Silva *et al.* (2020) apresenta maior produção de metabólitos secundários. E a última fase observada foi a de declínio, caracterizada

pela perda de peso devido a morte celular, a qual começou a partir do 63º dia. De acordo com a presente curva de crescimento não foi possível observar a fase estacionária.



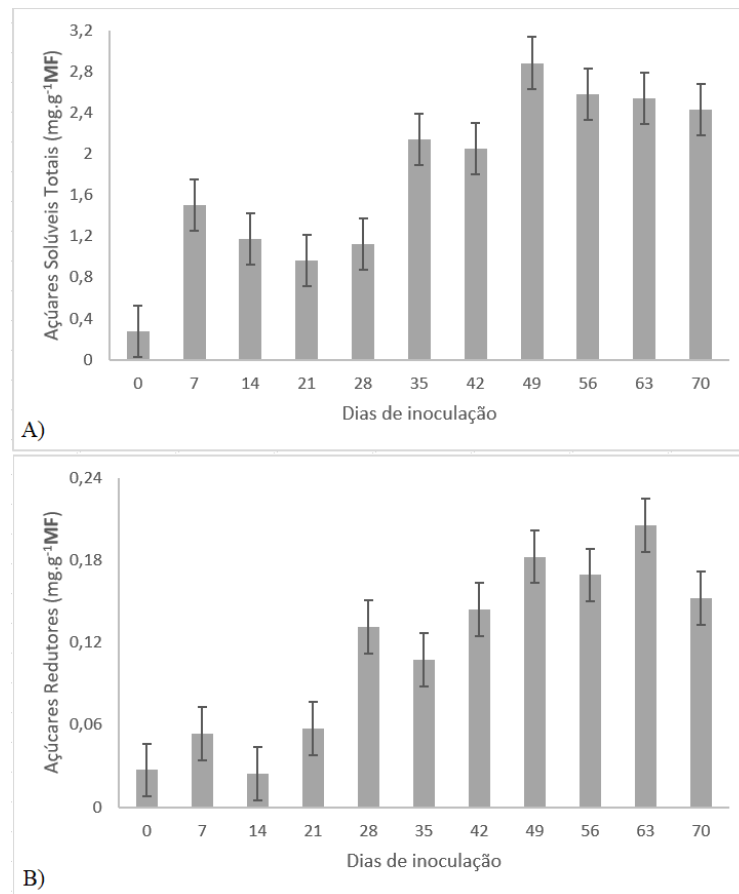
**Figura 14.** Calos do explante hipocótilo de *Physalis peruviana* em cada intervalo da curva de crescimento. Barra = 1 cm.

Em estudo realizado com *P. pubescens* L., Bertoncelli *et al.* (2014) descreveram a curva de crescimento de calos, a qual corrobora a presente pesquisa, pois também constatou a fase lag antes do 7º dia de inoculação e a fase exponencial com duração até o 21º dia. Porém o resultado diferiu a partir de então, pois os autores verificaram apenas a fase estacionária em seguida, e não conseguiram observar as fases linear, de desaceleração e de declínio.

### 4.3. Caracterização Bioquímica

Concomitantemente à curva de crescimento de calos, foram realizadas análises bioquímicas com intuito de avaliar o quantitativo de açúcares solúveis totais e redutores, proteínas e aminoácidos presentes nas amostras. De acordo com as análises quantitativas de açúcares solúveis totais (AST), foi observado uma menor quantidade de AST no tempo 0, enquanto este ainda é um explante, sendo possível perceber um aumento desses açúcares conforme os calos amadureciam, apresentando pico máximo ao 49º dia de inoculação (Figura 15A), resultado similar ao encontrado por Bertoncelli *et al.* (2014) em calos de *P. pubescens* L., que também apresentaram aumento de AST à medida que os calos alcançavam seu amadurecimento. Esse aumento em relação ao tempo 0 pode ter ocorrido devido a absorção da sacarose presente no meio de cultura, e embora tenha aumentado nos primeiros períodos, sua quantidade ainda é menor em relação aos últimos períodos o que pode estar relacionado a uma maior demanda energética no início da curva. Efeito parecido também ocorre na análise quantitativa de açúcares redutores (AR), uma vez que o maior pico foi obtido no 63º dia de inoculação (Figura 15 B). A quantidade de AR é menos expressiva que AST uma vez que este engloba também os açúcares não-redutores. Além disso, os AR, por serem monossacarídeos, são comumente mais consumidos que os AST que são moléculas maiores, mais complexas e intermediárias das vias bioquímicas.

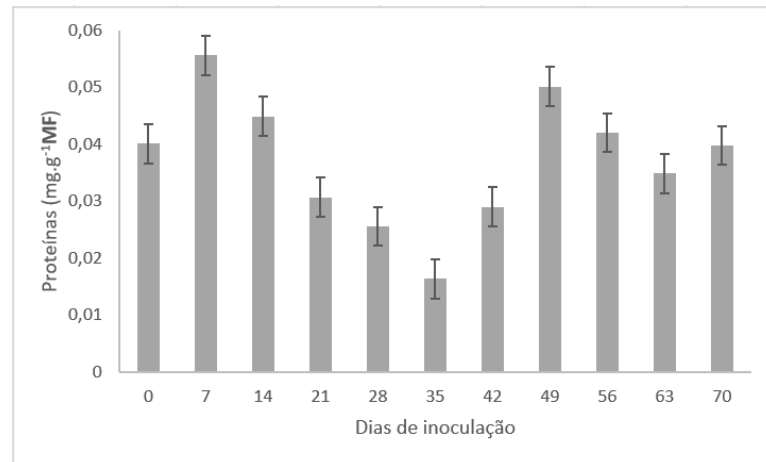
Os açúcares têm seus teores aumentados à medida que a demanda energética diminui durante o crescimento dos calos. A demanda energética é maior no período de intensa atividade mitótica (fase exponencial da curva, 7º até o 21º dia), ou seja, nos períodos iniciais vai haver maior consumo. Isso significa que nas fases finais do crescimento dos calos (linear e desaceleração), onde há uma atividade mitótica menor, uma vez que os calos diminuem seu ritmo de crescimento, os teores de açúcares estarão aumentados devido ao menor consumo destes.



**Figura 15.** Quantificação de açúcares solúveis totais (A) e açúcares redutores (B) em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca.

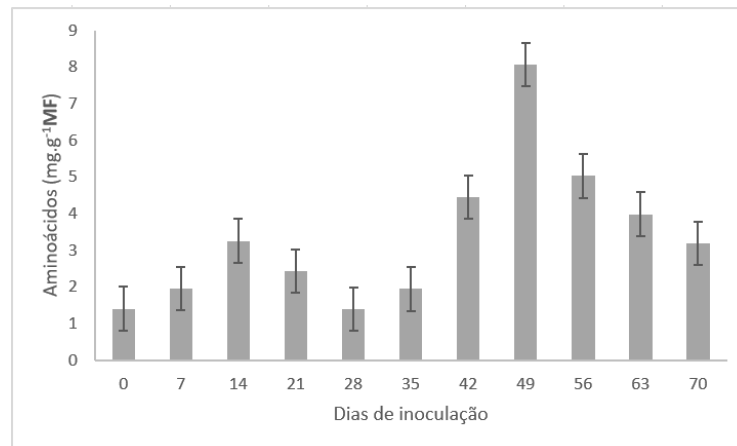
A análise quantitativa de proteínas totais apresentou dois picos no decorrer da curva de crescimento dos calos: o primeiro ao 7º dia, e após uma queda com valor mínimo ao 35º dia, o segundo pico ocorreu ao 49º dia (Figura 16). Os tempos iniciais, onde o explante está começando o processo de dediferenciação dos tecidos, surgimento de células meristemáticas e atividade mitótica intensa, é correspondente à fase exponencial da curva de crescimento dos calos, portanto existe muitas enzimas catalisando reações, além da duplicação de DNA (fase S do ciclo celular), logo tem uma maior quantidade de proteínas. Em calos de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.), Abbade *et al.* (2010) também observaram uma queda seguida de aumento dos teores de proteínas no período da fase linear de crescimento.

Notadamente nos primeiros períodos (7, 14, 21º dias) é possível identificar uma menor quantidade de açúcares redutores e uma alta produção de proteínas, isso pode ser explicado pelo fornecimento de energia dos carboidratos para síntese proteica.



**Figura 16.** Quantificação de proteínas totais em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca.

Segundo os resultados da análise quantitativa de aminoácidos, é possível observar um primeiro pico no 14º dia da curva, e logo após uma queda com valor mínimo ao 28º dia, sendo perceptível o maior pico ao 49º dia (Figura 17). O primeiro pico ocorreu na fase exponencial da curva de calo, caracterizada por ser uma fase de intensa atividade mitótica e produtora de compostos químicos complexos, como proteínas e ácidos nucleicos. Este resultado corrobora o obtido por Da Luz Costa *et al.* (2015) em calos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), os quais também apresentaram um incremento no conteúdo total de aminoácidos durante a fase lag e exponencial. Existem na literatura, relatos de herbicidas que inibem a síntese de aminoácidos, dentre estes a auxina 2,4-D (TEIXEIRA; DUQUE; SA-CORREIA, 2007). Esse regulador vegetal/herbicida foi adicionado ao meio de cultura no intuito de auxiliar no processo de calogênese, porém supõe-se que ele pode ter influenciado na quantidade baixa de aminoácidos, principalmente nos períodos iniciais, período no qual a auxina 2,4-D se apresenta em maior disponibilidade no meio de cultura, antes de começar sua degradação.



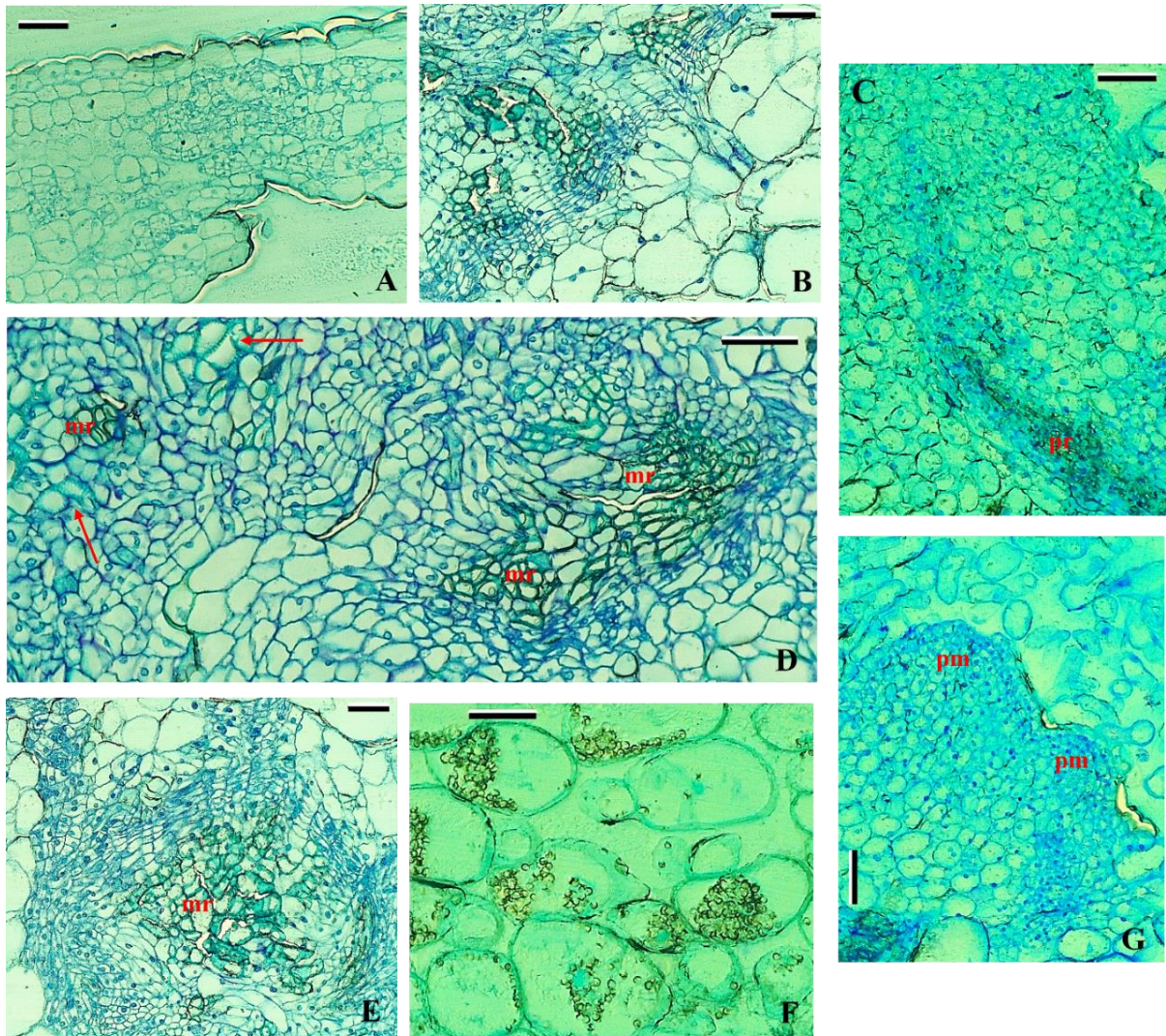
**Figura 17.** Quantificação de aminoácidos em calos de *Physalis peruviana* coletados em diferentes períodos de cultivo in vitro. MF = massa fresca.

Supõe-se que a baixa quantidade de aminoácidos nos dois períodos, ocorreu pela utilização destes para a síntese de proteínas durante a fase lag e linear de crescimento dos calos. De forma geral, até 28º dia é demonstrado uma menor quantidade de aminoácidos, que se pode relacionar a uma alta quantidade de proteínas nesses mesmos períodos.

#### 4.4. Caracterização Histológica

Através das observações microscópicas foi possível relatar células meristemáticas, acumulados de células caracterizadas como meristemóides, muitos traqueídes, bem como um procâmbio bastante característico. Em amostras coletadas no 7º e 14º dia de inoculação, no início da formação dos calos, foi possível observar grande atividade mitótica, com células meristemáticas, estejam elas pequenas recém-saídas da divisão, e/ou com área celular aumentada se preparando para posterior divisão (Figura 18 A e 18 B). Na maioria dos períodos a partir do 21º dia foi verificada a existência de meristemóides, quase sempre acompanhado por células que caracterizam um primórdio de vascularização dispersas no meristema fundamental, além de elementos vasculares traqueais (setas), demonstrado aqui pelas figuras 18 D e 18 E de calos coletados no 28º e 35º dia. A análise histológica constatou também em uma amostra de calo coletado no 42º dia de inoculação, células com conteúdo vacuolar caracterizado por material de reserva (Figura 18 F). Em corte anatômico de calo coletado no 49º dia foi possível a visualização de procâmbio, com células

que caracterizam os primórdios do xilema (Figura 18 C). Outra estrutura observada, em calo coletado no 56º dia de inoculação, foi um conjunto de células ativas que caracteriza um pseudomeristemóide apresentando uma fina camada epidérmica (Figura 18G).



**Figura 18.** Cortes anatômicos de calos de *Physalis peruviana*. A e B = células em atividade mitótica, barra A = 200µm e barra B = 100µm. C = procâmbio, barra = 100µm. D e E = meristemóides com início de vascularização, e elementos vasculares traqueais (seta), barra = 100µm. F = conteúdo vacuolar (material de reserva), barra = 100µm. G = pseudomeristemóide em crescimento, barra = 100µm. mr = meristemóide; pr = procâmbio; pm = pseudomeristemóide.



#### 4.5. Avaliação da viabilidade celular dos calos

A utilização do corante TTC (2,3,5-cloro de trifeniltetrazólio) nesse teste colorimétrico demonstrou a existência de enzimas desidrogenases ativas nas células dos calos de *P. peruviana* pela presença de uma coloração avermelhada (Figura 19). Essas enzimas estão envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos e sua atividade confirma a viabilidade do tecido vegetal.

Através das observações microscópicas, também foi possível afirmar a presença de células em divisão ativa assimétrica em suspensão, além de células caracterizadas como potencialmente embriogênicas, pequenas e isodiamétricas (Figura 19). Segundo Duditis *et al.* (1995), um importante fator que indica o estabelecimento da polaridade e início do desenvolvimento embriogênico é o padrão assimétrico da primeira divisão, podendo esta ser uma consequência da migração do núcleo da região central para a periferia da célula. Através das observações microscópicas foi possível retratar algumas células neste padrão de primeira divisão assimétrica com núcleos periféricos (Figuras 19 A e 19 C2).

Outra característica de células embriogênicas é a divisão celular rápida com expansão celular reduzida, resultando em células pequenas e isodiamétricas (DUDITIS *et al.*, 1995). Esse padrão de células foi observado no presente trabalho (Figuras 19 B e 19 C1), corroborando os resultados encontrados por Carneiro *et al.* (2014) em células de calo de *Agave sisalana* Per., os quais demonstraram a presença de células em primeira divisão assimétrica bem como algumas células embriogênicas isoladas em tamanho diminuto, através do experimento de coloração com o TTC.



**Figura 19.** Perfil das células encontradas em calos de *Physalis peruviana* com 49 dias de inoculados e coradas com TTC. A e C2 = Estruturas embriogênicas polarizadas, resultado das primeiras divisões celulares. B e C1= células embriogênicas isoladas. Barra = 100 $\mu$ m.

#### 4.6. Caracterização Fitoquímica

Com a obtenção dos extratos vegetais foi possível calcular os rendimentos dos processos de extração. O rendimento do extrato metanólico dos calos com 28 dias foi de 2,06%, sendo um pouco menor que o rendimento dos calos com 49 dias (2,10%) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Rendimento dos extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*.

	Calos com 28 dias de inoculação	Calos com 49 dias de inoculação
<b>Massa utilizada</b>	0,8g	2,7g
<b>Massa do extrato</b>	0,0165g	0,0568g
<b>Rendimento</b>	2,06%	2,10%

A análise qualitativa dos extratos metanólicos de calos de *P. peruviana* com 28 e 49 dias de cultivo in vitro não apresentou diferença no perfil fitoquímico em relação ao tempo de cultivo (Tabela 14).

**Tabela 14.** Perfil fitoquímico nos extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*

Metabólitos	Calos com 28 dias de inoculação	Calos com 49 dias de inoculação
Alcaloides	+	+
Compostos Fenólicos	+	+
Esteroides e Terpenos	-	-
Flavonoides	-	-
Cumarinas	-	-

(+): Presença; (-): Ausência.

Nos extratos dos calos em ambos os períodos da curva foi possível identificar compostos fenólicos e alcaloides como metabólitos secundários presentes nas amostras, estando ausentes cumarinas, flavonoides, esteroides e terpenos (Figura 20). Para o teste de determinação dos alcaloides, foi adicionado o reagente de Dragendorff, e obteve-se uma coloração alaranjada intensa e formação de precipitado esbranquiçado indicando a presença desse metabólito nas amostras (Figura 20 A).

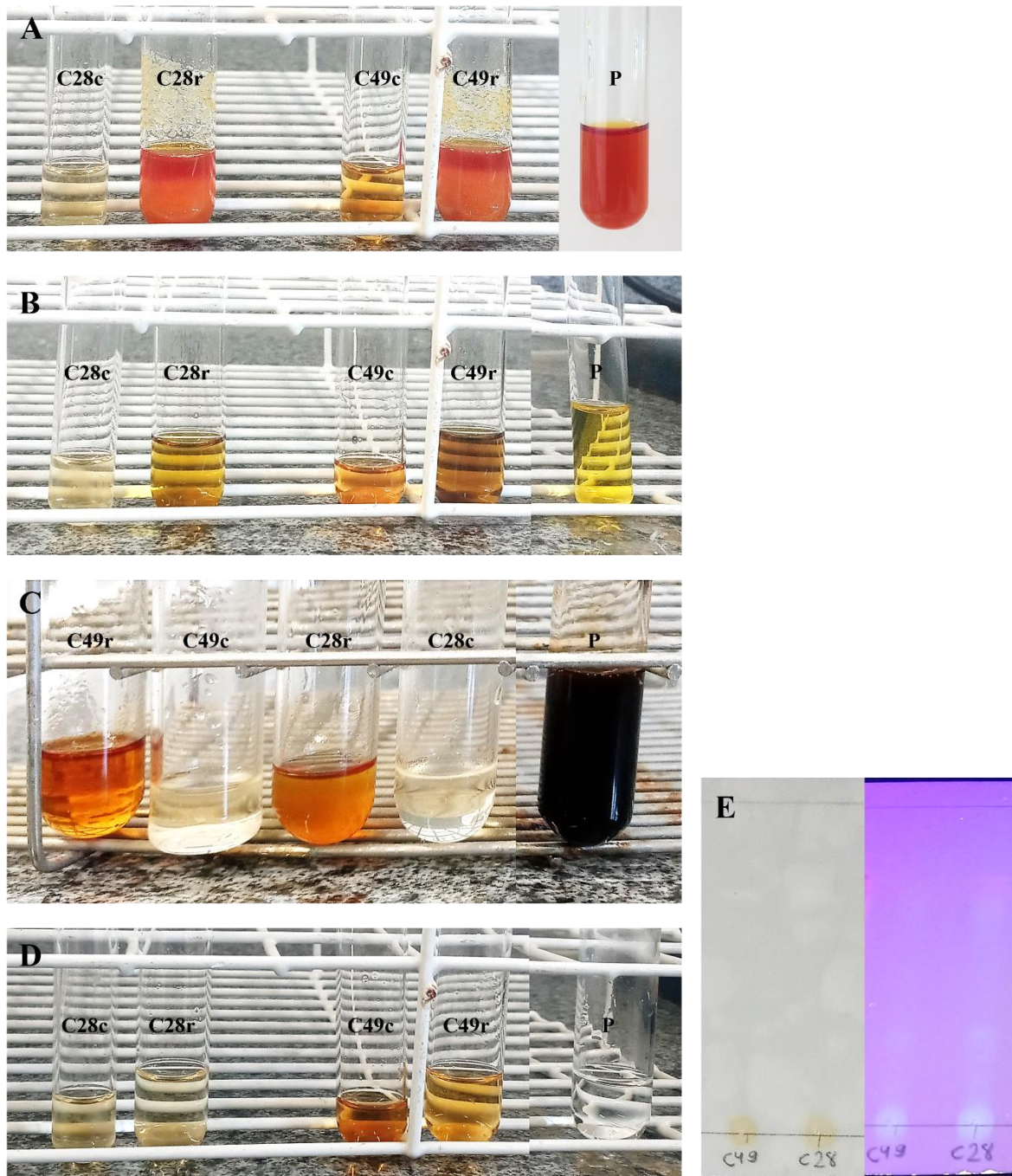
Os alcaloides são formados de átomos de nitrogênio que conferem alcalinidade a esses compostos, e são subdivididos em classes como indóis, quinolinas, isoquinolinas, pirrolidinas, piridinas, tropanos, terpenóides e esteróides (KUREK, 2019). Os alcaloides constituem um grupo de metabólitos secundários bastante importante para indústria farmacêutica devido a sua atividade antibacteriana, antioxidante, antimalárica, estimulante, anti-inflamatória, anticancerígena, analgésica e anestésica, neurofarmacológicas, antimicrobianas, antifúngicas, hipnótica, psicotrópica, antitumoral, dentre muitas outras (DEY *et al.*, 2020; KUREK, 2019). Nas plantas, os alcalóides são sintetizados e utilizados numa importante função biológica: como pesticidas e como forma de proteção contra herbivoria devido a seu sabor amargo (DEBNATH *et al.*, 2018).

Para o teste de compostos fenólicos, a adição do cloreto férrico 1% modificou um pouco a coloração para um amarelado escuro, também indicando presença desse metabólito nas amostras (Figura 20 B). Os compostos fenólicos são comumente constituídos por um ou mais anéis aromáticos acoplados a um ou mais grupos hidroxila, e são diversamente classificados em lignanas, taninos, ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóides (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021). Nas plantas, atuam na defesa contra raios ultravioleta, patógenos e predadores, além de serem responsáveis pelas características organolépticas dos alimentos vegetais, sendo assim compostos atrativos para a indústria alimentícia (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021; DE LA ROSA, 2019). A importância medicinal desses metabólitos secundários reside na sua atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antiproliferativa, o que desperta grande interesse de indústrias farmacêuticas e cosméticas no uso dessas moléculas para formulação de produtos nutracêuticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; DE LA ROSA, 2019).

Para os outros testes colorimétricos, a adição dos reagentes de Liebermann-Burchard (esteróides e terpenos) e cloreto de alumínio 2% (flavonóides) não demonstrou coloração indicativa

de presença de metabólitos nas amostras (Figura 20 C e 20 D). Todos os testes foram realizados por análise colorimétrica, exceto o teste para determinação de cumarinas, que foi realizado por cromatografia em camada delgada (ccd) utilizando os solventes hexano e acetona (6:4) e observando em luz ultravioleta, sendo que este não apresentou modificações indicativas de presença desse metabólito (Figura 20 E).

Em análise fitoquímica de folhas de *Physalis angulata* cultivadas com ABA (ácido abscísico), Moreira *et al.* (2020) corroboram esse resultado pois também atestam a presença de compostos fenólicos nas amostras. Porém Mastuti e Rosyidah (2021) diferem do resultado do presente trabalho uma vez que relatam presença de flavonóides, esteróides e terpenos em amostras de vários tecidos de *P. angulata*. Em calos de beringela (*Solanum melongena* L.), Daud *et al.* (2021) corroboraram o resultado da presente pesquisa ao observar presença de alcaloides, porém verificaram também presença de flavonoides e terpenos, diferindo do resultado desse estudo. Elnour, Mahmood e Yagoub (2014) obtiveram resultado semelhante ao citado anteriormente, pois verificaram presença de alcaloides e flavonoides em análise fitoquímica de calos de *Datura stramonium* L.



**Figura 20.** Análises fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos metanólicos de calos de *Physalis peruviana*. A = Teste de alcalóides utilizando o reagente de Dragendorff. B = Teste de compostos fenólicos utilizando o cloreto férrico 1%. C = Teste para esteróides e terpenos utilizando o reagente de Liebermann-Burchard D = Teste para flavonóides utilizando cloreto de alumínio 2%. E = Teste para cumarinas em ccd utilizando hidróxido de sódio como reagente. C28c = extrato metanólico de calos aos 28 dias de inoculação; C28r = extrato de calos aos 28 dias de inoculação + reagente; C49c = extrato metanólico de calos aos 49 dias de inoculação; C49r = extrato de calos aos 49 dias de inoculação + reagente; P = padrão: reagente + água destilada.

Este é o primeiro estudo de calogênese em *Physalis peruviana* com análises histomorfológicas, bioquímicas e fitoquímicas, o qual pode auxiliar trabalhos futuros que visem explorar o potencial dos calos desta espécie.

## 5. CONCLUSÃO

A utilização de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP e 9,00  $\mu\text{M}$  de 2,4-D em explante hipocótilo é indicado para indução de calos de *Physalis peruviana*.

A curva de crescimento de calos de *Physalis peruviana* apresenta todas as fases exceto a estacionária.

Calos de *Physalis peruviana* apresentam grande quantidade de açúcares solúveis totais e aminoácidos.

A análise histológica aponta potencial organogênico dos calos de *Physalis peruviana*.

A avaliação com o corante cloreto de trifeniltetrazólio confirma a viabilidade dos calos de *Physalis peruviana*.

A análise fitoquímica dos calos de *Physalis peruviana* confirma a presença de alcalóides e compostos fenólicos.

O tempo de cultivo não interferiu na produção dos metabolitos secundários dos calos de *Physalis peruviana*.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C. *et al.* Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipe-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v. 33, 2010.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ALBUQUERQUE, B. R. *et al.* Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
- ALVARADO, D. Z. *et al.* Morfogênese in vitro de *Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e69416-e69416, 2021.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados-Documentos** (INFOTECA-E), 2002.
- BERTONCELLI, D. J. *et al.* Establishment and content of sugars and phenols in *Physalis* callus obtained from different explants and concentrations of bap and naa. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 1, p. 27-33, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARMO, L. P.; MOURA, C. W. N. ; LIMA-BRITO, A. Effects of seaweed extracts on the in vitro multiplication of plants. In: Gupta, S.; Van Staden, J. (Org.). **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Academic Press: Londres. 2021, p. 211-230.
- CARNEIRO, F. S. *et al.* Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294-303, 2014.
- CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* Embriogênese Somática. **Embrapa Algodão**, v. 1, p. 35, 2006a.
- CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* Considerações Gerais Sobre Organogênese. **Embrapa Algodão**. Documento 150, 26 p., Campina Grande: 2006b.

CHANDRAN, H. *et al.* Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00450, 2020.

CHATTOPADHYAY, S. *et al.* Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 3, p. 138-149, 2002.

ÇÖMLEKÇIOĞLU, N.; ÖZDEN, M. Effects of colchicine application and ploidy level on fruit secondary metabolite profiles of goldenberry (*Physalis peruviana* L.). **Appl Ecol Environ Res**, v. 18, n. 1, p. 289-302, 2019.

CONCEIÇÃO, I. S. C.; CARMO, L. P.; LIMA-BRITO, A. Cost reduction in the micropropagation of *Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme. **Colloquium Agrariae**, v. 17 n. 3, p. 12-20, 2021.

DA LUZ COSTA, J. *et al.* Callus growth kinetics of physic nut (*Jatropha curcas* L.) and content of fatty acids from crude oil obtained in vitro. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 892-902, 2015.

DAUD, N. *et al.* Callus Induction and Phytochemical Constituents of Finger Eggplant (*Solanum* sp.). **Walailak Journal of Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2021.

DEBNATH, B *et al.* Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 56-72, 2018.

DE LA ROSA, L. A. *et al.* Phenolic compounds. *In: Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. Woodhead Publishing, 2019. p. 253-271.

DEO, P. C. *et al.* Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 28, n. 1, p. 27-40, 2010.

DEY, P. *et al.* Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *In: Recent advances in natural products analysis*. Elsevier, 2020. p. 505-567.

DUDITIS, D. *et al.* Molecular biology of somatic embryogenesis. *In: THORPE, T. A. (ed.) In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 267-308, 1995.



ELNOUR, M. E. M.; MAHMOOD, F. Z. A.; YAGOUB, S. O. Callus induction and antimicrobial activities of callus and intact plant extracts of *Datura stramonium* L. **Int J Sci Res.** v. 3, n. 8, p. 1105-1109, 2014.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. **Plant physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020.

ESCOBAR-GUZMÁN, R. E. *et al.* In vitro embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 2, p. 181–189, 2009.

FEITOSA, L. S. *et al.* Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FILIPPI, S. B. **Embriogênese somática da bananeira (Musa spp): indução, maturação e análise morfo-anatômica.** 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation and micropropagation: Plant propagation by tissue culture.** Exegetics, Edington. II, p. 37-66, 1996.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, O. T. *et al.* Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuya (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 708-715, 2008.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI; p. 533-568, 1999.

GUPTA, A. K.; GOVIL, C. M. Morphogenetic studies in goose berry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 69, n. 1-2, p. 93-97, 1990.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de Janeiro:

EDUR. 198 p. 1997.

KUREK, J. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. *In: Alkaloids: Their importance in Nature and Human life*. United Kingdom: IntechOpen, p.1-8, 2019.

LAGOS, T. C. *et al.* Biología reproductiva de la uchuva. **Acta Agronómica**, v. 57, n. 2, p. 81-87, 2008.

LASHIN, I. I.; ELHAW M. H. Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. **International Journal of Modern Botany**, v. 6, n. 1, p. 10-17, 2016.

LIMA, C. S. M. *et al.* Qualidade pós-colheita de *Physalis* sob temperatura ambiente e refrigeração. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 3, p. 311-317, 2013.

LIMA, E. C. *et al.* Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos in vitro a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.

MASCARENHAS, L. M. S.; SANTANA, J. R. F.; LIMA-BRITO, A. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 55603, 2019.

MASTUTI, R.; ROSYIDAH, M. In Vitro Environmental Stresses for Enhancing Withanolides Production in *Physalis angulata* L.). **IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.** v. 239, p. 012011, 2019.

MASTUTI, R.; ROSYIDAH, M. Diversity of bioactive secondary metabolites produced by medicinal plants of *Physalis angulata* L. (Ciplukan). **IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.** v. 743, p. 012081, 2021.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MORDHORST, A. P. *et al.* Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 6, p. 535-576, 1997.

MOREIRA, G. C. *et al.* Phenolic compounds and photosynthetic activity in *Physalis angulata* L. (Solanaceae) in response to application of abscisic acid exogenous. **Phytochemistry Letters**, v. 40, p. 96-100, 2020.

MROGINSKI, L. A. ; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura – fundamentos y aplicaciones**. CIAT: Cali, p. 19-40, 1993.

MUNIZ, J.; MOLINA, A. R.; MUNIZ, J. Physalis: Panorama produtivo e econômico no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 1, 2015.

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

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.

NOVOA, R. H. *et al.* La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12 °C (*Physalis peruviana* L.). **Agronomía colombiana**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2006.

OLIVARES-TENORIO, M. L. *et al.* Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): Review from a supply chain perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 83–92, 2016.

OLIVEIRA, J. A. R. *et al.* *Physalis angulata* L. propagation in vitro. **Revista Ceres**, v. 66, p. 486-492, 2019.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Establecimiento in vitro e crescimento inicial de *Physalis angulata* (Solanaceae). **SITIEN TIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-5, 2013.

PAGARE, S. *et al.* Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1996.

PUENTE, L. A. *et al.* *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1733–1740, 2011.

RAMÍREZ, F. *et al.* Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) phenology according to the BBCH

phenological scale. **Scientia Horticulturae**, v. 162, p. 39-42, 2013.

**RHS Mini Colour Chart**. London & Leiden; RHS & Flower Council of Holland. 2005.

RODRIGUES, F. A. *et al.* Caracterização física, química e físico-química de *Physalis* cultivada em casa de vegetação. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1411-1414, 2014.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatos* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 587-590, 2011.

RUFATO, A. R. *et al.* A cultura da physalis. **Embrapa Uva e Vinho**, Série Fruticultura - Pequenas frutas, CNPUV, 2013.

ŞAHİN, G. Effects of salicylic acid and heat acclimation on thermotolerance and withanolide accumulation under high temperature stress in the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Turkish Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 468-474, 2019.

SALIM, S. A. *et al.* Determination of secondary metabolites in callus and different tissues of *Physalis angulate* L. **Res. Crops**, v. 20, p. 642-647, 2019.

SANTOS, D. N. *et al.* Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2268-2273, 2010.

SANTOS, D. N. *et al.* Cytological characterization of *Jatropha curcas* callus in different periods of cultivation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 228-233, 2013.

SILVA, T. S. *et al.* Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 700-717, 2020.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA, C. L. M. *et al.* Biometric characteristics of fruits and physiological characterization of seeds of *Physalis* species (Solanaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 277-282, 2017.

SOUZA, J. C.; RESCAROLLI, C. L. S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

STEHMANN, J.R.; KNAPP, S. 2020. **Physalis in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14696>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Artmed Editora, Porto Alegre. 2017.

TAPIA, M. E.; FRIES, A. M. **Guía de campo de los cultivos andinos**. Lima: FAO, ANPE. 2007. 209 p.

TEIXEIRA, M. C.; DUQUE, P.; SA-CORREIA, I. Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 363-370, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. 864 p.

VASCONCELOS, J.N.C. *et al.* Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry reviews**, v. 1, n. 1, p. 13-25, 2002.

VILLEGAS, I. C. I. El cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana*). Proyecto Microcuencia Plantón – **Pacayas Boletín Técnico** n. 10. San José, Costa Rica, 2009.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants in vitro. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, 1996.

WEST, M. A. L.; HARADA, J. J. Embryogenesis in higher plants: An overview. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1361–1369, 1993.

XU, G. *et al.* Cytotoxic physalins from aeroponically grown *Physalis acutifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 2, p. 187-194, 2021.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of aminoacid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

YILDIZ, G. *et al.* Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2320–2327, 2015.

YOUSRY, M. M. In vitro Propagation and Somatic Embryogenesis in Egiptian Husk Tomato (*Physalis pubescens* L.). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 1415–1425, 2013.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411–1423, 1993.