



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



**LILIAN MARCIA SANTANA MASCARENHAS**

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS E  
FITOQUÍMICAS DE *Physalis peruviana* L.**

Feira de Santana - BA

2018

**LILIAN MARCIA SANTANA MASCARENHAS**

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS E  
FITOQUÍMICAS DE *Physalis peruviana* L.**

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

Orientadora: Prof. Dra. Alone Lima Brito

Feira de Santana - BA

2018

**Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado**

M361m Mascarenhas, Lilian Marcia Santana  
Micropropagação e análises bioquímicas e fitoquímicas de *Physalis peruviana* L. / Lilian Marcia Santana Mascarenhas. - 2018.  
75 f.: il.

Orientadora: Alone Lima Brito.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

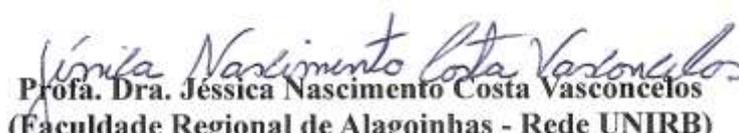
1. *Physalis peruviana* L. – Análise bioquímica. 2. *Physalis peruviana* L. – Análise fitoquímica. I. Brito, Alone Lima, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.951.4

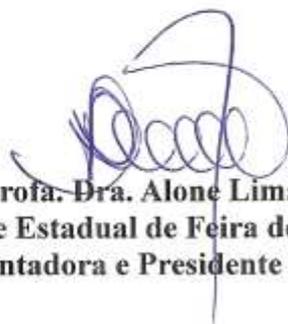
**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)**



**Prof. Dra. Jéssica Nascimento Costa Vasconcelos**  
**(Faculdade Regional de Alagoinhas - Rede UNIRB)**  
**(Faculdade Estácio de Alagoinhas)**



**Prof. Dra. Alone Lima Brito**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)**  
**Orientadora e Presidente da Banca**

*À minha família,  
“Meu mundo e nada mais”!  
Dedico...*

*À Alone,  
Pela dedicação, orientação paciente e segura,  
por compreender as minhas dificuldades e  
obstáculos e pela confiança em mim  
depositada.*

*Ofereço...*

## AGRADECIMENTOS

Eu me vi inteira nesta dissertação. Vi nestes escritos a minha trajetória nestes dois anos. Hoje sou pura gratidão à Deus, INEFÁVEL, pela saúde, força, coragem, superação e principalmente, por me fazer perceber que não importa as provações, a minha fé em Ti, meu Pai, é inabalável. Na infinidade de situações que vivi nestes dois anos, saber percebê-las, recebê-las e valorizá-las foi fundamental para que eu vivesse nesses anos um caminho feliz.

Aos meus pais - José Raimundo e Maria José, aos meus irmãos – Ricardo, Luciana, Liliane, às minhas sobrinhas – Rafaela e Joyce, e minha tia - Maria José, que tanto reclamaram a minha ausência, pois as atividades do curso e inúmeros dias em frente ao computador dissertando e estudando me deixaram “longe”. Mas, ainda há tempo, pois temos uma vida inteira para continuarmos FAMÍLIA! Obrigada por serem as joias mais preciosas da minha vida e iluminarem com a existência de vocês o meu próprio ato de respirar.

A Jonatan Silva Santos, meu relicário, pela amizade, apoio e incentivo. Uma das pessoas mais lindas que já conheci, o melhor amigo que a vida poderia me presentear. Obrigada por TUDO!

Aos meus tios – Paulo, Zildete e Maria por me adotarem com tanto carinho, amor, preocupação e cuidado. Aos meus primos – Edson, Antônio e Cristiane, Ivy, Gabriel e a Manoel, por me proporcionarem momentos de muitos sorrisos, diversão, por vezes regados de pura adrenalina. À Lys pela doçura que me recebeu e a Victor pelas aulas de inglês.

A Bruno Ayala, pelo carinho, preocupação, consideração e pelos inúmeros e sinceros sorrisos compartilhados, pelas horinhas de “fuga” na escrita, e principalmente pela companhia. Esse período se tornou leve com a sua amizade e carinho incondicional.

A Noel Barbosa, o melhor cunhado que eu poderia ter. Obrigada pelas mãos estendidas nos momentos que mais precisei! Você me inspira na busca por dias melhores!

À Jéssica Vasconcelos, por acreditar no meu potencial e proporcionar o melhor para mim. Em todos os caminhos desconhecidos que me propus seguir teve um punhado de você. Obrigada pelo incentivo e pela confiança em mim depositada.

À Alone Lima Brito, minha “mãe científica”, por oportunizar meu retorno ao meio acadêmico, pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, ensinamentos, dedicação, paciência, competência, eficiência e todo ânimo que me transmitiu desde o momento em que me aceitou como aluna. Já diziam e agora eu posso constatar, você é mesmo um anjo! Dizer-lhe obrigada é pouco diante do que representou nesse período!

Ao professor José Raniere, pelos ensinamentos, pelo apoio, e principalmente por compartilhar comigo a sua fé.

À Katiane, primeira pessoa que vi no prédio do LABIO, aguardando a seleção para o mestrado. Mal sabia que estava ali, diante de mim, meu presente de Deus. Seu carinho, dedicação, cuidado, atenção e generosidade preencheram os meus dias. Obrigada por TUDO!

À Flávia Souza pela paciência, por atender às minhas solicitações com tanta generosidade, por me ensinar a usar o SISVAR, pelo auxílio na estatística, pela amizade construída, pelas orações e por me inspirar em tantas situações.

À Jéssica Andrade, por me “emprestar o seu cérebro” quando o meu falhava.

À Andressa Piancó, por me atender em todos as mensagens e e-mails, sempre me orientando nas minhas “desorientações” estatísticas, você é mesma *expert* nessas análises! Já sinto saudades do repertório eclético que embalava as nossas tardes, transitando pelo pop rock, MPB, samba, axé, pagode, internacional e até mesmo àquelas músicas do fundo do baú, embaladas pela nossa voz desafinada, mas feliz, enquanto você gritava: “bora Lilian”!

À Dinah, Amanda, Jaqueline e Akemi. Garotas, vocês são ótimas! Obrigada por tudo que fizeram por mim. Adotaria vocês, fácil, fácil no doutorado.

À Tecla, Luane, Tailane, Fernanda e Bárbara pela agradável convivência.

À Amanda Souza, prima querida por me auxiliar nas correções textuais.

Ao colégio João Paulo, especialmente à Audato, Jane, Sirleyde, Raquel, Laura, Neima, Marcia e Alan, minha eterna gratidão pelo apoio e incentivo em todo período. O carinho, respeito e compreensão de todos vocês revigoraram minhas forças.

À Fabiana, pelas orações e por compreender a minha ausência.

Às minhas lindas amigas, Leilane Leal, Claudia Gonçalves, Rosangela Bispo e Yuka Fujiki, pela confiança, carinho, incentivo e orações e ao meu amigo Gérson Limão pela edição das imagens para o simpósio de RGV.

Agradeço a Wasley, por toda assistência, disposição sempre que solicitado, e por me deixar usufruir do seu QI elevado. Sempre me lembrarei que “no final tudo dá certo”.

Aos colegas do curso pelo aprendizado e convivência maravilhosa, em particular, a Lucas Sampaio e Hortência Kardec, pela humildade, parceria, solidariedade e incentivo.

Aos professores da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelas aulas maravilhosas. Em especial, às Professora Marilza Neves e Claudíneia Pelacani, que despertaram em mim uma verdadeira paixão pela Fisiologia.

À Natália Barroso, pela generosidade, atenção e mãos estendidas, sempre que solicitada.

À Tamara e Romeu pela ajuda.

A Juninho Pereira e a Laysa Correia pela tradução do resumo.

A Genilval Júnior Vapor, pelas edições nas imagens dos cortes anatômicos.

Ao professor Hugo pela concessão dos laboratórios LABIV e LAEX e por disponibilizar suas alunas para me auxiliarem nas análises fitoquímicas.

Às garotas do LAEX, pelo auxílio na fitoquímica: Dayse, com a nas etapas iniciais; Jéssica Lima por me auxiliar nos experimentos e compartilhar comigo o seu saber; e à Danielle Figuéredo pelas sugestões e correções no texto da fitoquímica.

Ao pessoal do LAMIV pela gentileza, especialmente à professora Cláudia Elena, pela paciência e persistência com os cortes anatômicos.

Aos funcionários da Unidade Experimental Horto Florestal, pela atenção e pelas conversas descontraídas.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Fundação de apoio à Pesquisa (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na execução dessa pesquisa.

A Banca examinadora pelas contribuições valiosas a esse trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, o meu muito obrigada!

## RESUMO

*Physalis peruviana* L. (Solanaceae) é uma frutífera herbácea, que vem se consolidando no mercado de pequenas frutas em virtude das suas potencialidades nutricionais, medicinais e relevante concentração de vitaminas, sais minerais e metabólitos secundários de interesse à indústria farmacêutica. As limitações à sua produção são o ciclo reprodutivo curto, o acometimento dos frutos por pragas e a carência de estudos para a espécie. A micropropagação constitui-se numa alternativa para propagação de espécies medicinais, visto que esta técnica permite a produção de um grande número de mudas com qualidade fitossanitária, além de se constituir uma ferramenta para o melhoramento genético e para estudos fitoquímicos. Esse estudo se propôs a avaliar a morfogênese *in vitro* de *P. peruviana* e analisar o perfil bioquímico e fitoquímico da espécie em diferentes cultivos. Explantes de nó cotiledonar, cotilédone, folha, epicótilo, hipocótilo e raiz foram inoculados em meio de cultura MS com metade das concentrações salinas e suplementado com BAP (0,00; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88  $\mu\text{M}$ ), acrescido de 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar; e o explante nó cotiledonar foi submetido à (0,00; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88; 13,32; 17,76 e 22,20  $\mu\text{M}$ ). Verificou-se que o nó cotiledonar submetido à concentração de 12,50  $\mu\text{M}$  de BAP é a melhor fonte de explante, com regeneração dos brotos via organogênese direta, e a folha é o explante mais eficiente para a organogênese indireta em concentrações de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP. A análise histológica comprovou as vias de regeneração. Os brotos provenientes da organogênese direta foram enraizados *in vitro* em meio  $\text{MS}\frac{1}{2}$  isento de regulador vegetal, e as microplantas aclimatizadas em terra vegetal, alcançaram 100% de sobrevivência aos 90 dias da aclimatização. Realizou-se análises bioquímicas e fitoquímicas dos explantes caule, raiz e folhas *in vitro* e *ex vitro*. As análises evidenciaram que o cultivo *in vitro* favorece a síntese de proteínas e açúcares redutores em tecidos de folhas e raízes. O metabólito rutina é produzido em explantes foliares em casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos. Organogênese. BAP. Metabólitos secundários. Rutina.

## ABSTRACT

*Physalis peruviana* L. (Solanaceae) is a fruit herbaceous, which has been consolidating in the small fruit market due to its nutritional, medicinal potentialities and relevant concentration of vitamins, minerals and secondary metabolites of interest to the pharmaceutical industry. The barriers to its production are the short reproductive cycle, the involvement of the fruits by pests and the lack of studies for the species. Micropropagation is an alternative for the propagation of medicinal species, since this technique allows the production of a large number of seedlings with phytosanitary quality, besides being a tool for genetic improvement and for phytochemical studies. This study aims to evaluate the *in vitro* morphogenesis of *P. peruviana* and to analyze the biochemical and phytochemical profile of the species in different cultures. Cotyledon node, cotyledon, leaf, epicotyl, hypocotyl and root explants were inoculated in half-saline MS culture medium supplemented with BAP (0,00; 2,22; 4,44; 6,66 and 8,88  $\mu\text{M}$ ), plus 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose and 7 gL<sup>-1</sup> of agar; and the explant cotyledonary node was submitted to (0,00; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88; 13,32; 17,76 and 22,20  $\mu\text{M}$ ), plus 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose and 7 gL<sup>-1</sup> of agar. It was verified that the cotyledon node submitted to the concentration of 12,50  $\mu\text{M}$  BAP is the best source of explant, with regeneration of the shoots via direct organogenesis, and the leaf is the most efficient explant for the indirect organogenesis in concentrations of 4,44  $\mu\text{M}$  BAP. Histological analysis proved the pathways of regeneration. The shoots from the direct organogenesis were rooted *in vitro* in MS<sup>1/2</sup> medium free of plant regulator, and the microplants acclimatized in vegetal soil, reached 100% survival at 90 days of acclimatization. Biochemical and phytochemical analyzes of stem, root and leaf explants were carried out *in vitro* and *ex vitro*. The analysis showed that *in vitro* cultivation favors the synthesis of proteins and reducer sugars in leaf and root tissues. The metabolite rutin is produced in leaf explants in greenhouse.

Key words: Tissue culture. Organogenesis. BAP. Secondary metabolites. Rutin.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
<b>2.1</b>	<b>Família Solanaceae</b>	13
2.1.1	Gênero <i>Physalis</i>	13
2.1.2	<i>Physalis peruviana</i> L.	14
2.1.2.1	A <i>Physalis peruviana</i> L. e a produção de metabólitos secundários	17
<b>2.2</b>	<b>CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS</b>	18
2.2.1	Cultura de tecidos vegetais e o gênero <i>Physalis</i>	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
<b>3.1</b>	<b>Estabelecimento <i>in vitro</i></b>	24
<b>3.2</b>	<b>Multiplificação</b>	24
3.2.1	Efeito do tipo de explante e do BAP na morfogênese	24
3.2.2	Multiplificação via organogênese direta	25
3.2.3	Multiplificação via organogênese indireta	26
<b>3.3</b>	<b>Enraizamento <i>in vitro</i></b>	26
<b>3.4</b>	<b>Aclimatização</b>	27
<b>3.5</b>	<b>Condições de cultivo</b>	28
<b>3.6</b>	<b>Análise histológica</b>	28
<b>3.7</b>	<b>Análises bioquímicas</b>	28
3.7.1	Preparo dos extratos	29
3.7.2	Análise de proteínas solúveis, açúcares redutores e açúcares solúveis totais	29
3.7.3	Teor de clorofila	29
<b>3.8</b>	<b>Análise fitoquímica</b>	31
3.8.1	Obtenção do extrato seco	31
3.8.2	Análise de compostos fenólicos utilizando CLAE – DAD	32
3.8.3	Quantificação dos compostos fenólicos totais por técnica espectrofotométrica	33
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística</b>	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	60
	<b>REFERÊNCIAS</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

*Physalis* é um gênero da família *Solanaceae*, estabelecido por Linnaeus em 1753, compondo-se de mais de 100 espécies (LIMA, 2009; MOURA, 2013), entre as quais encontra-se *Physalis peruviana* L., uma herbácea, frutífera, perene, originária dos Andes. Seu centro de biodiversidade é o México, porém, é na Colômbia que se dá a maior produção e exportação da fruta e seus derivados (RUFATO et al., 2008; WHITSON, 2012).

O significativo potencial de exploração da espécie é decorrente de suas propriedades organolépticas, nutracêuticas e medicinais (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN, 2014). O aproveitamento total da espécie viabiliza um rápido retorno financeiro (SILVEIRA et al., 2012), pois além da utilização dos frutos para consumo *in natura* ou no preparo de diversas receitas (VILLEGAS, 2009), as raízes e folhas são utilizadas na indústria farmacêutica (MUNIZ et al., 2011) e o cálice, em decoração de doces (SCHNEID, 2008).

*P. peruviana* tem despertado interesse no campo científico e por parte dos consumidores pelas propriedades associadas à sua composição química, rica em fitaesteróis, vitanolídeos, carotenoides, compostos fenólicos, fisalinas (PUENT et al., 2011), ácido ascórbico, vitamina A, ferro e fósforo (LIMA, 2009; VELASQUEZ et al., 2007) e por ter revelado importantes atividades biológicas com ação antibiótica, antioxidante, anticancerígena e anti-inflamatória (MUNIZ et al., 2015).

A propagação de *P. peruviana* geralmente é feita por via sexuada, mediada por sementes, e assexuada, através de estacas (CHAVES et al., 2005; LANNA et al., 2013); e embora a propagação por sementes seja vantajosa em virtude da abundância num único fruto, das elevadas taxas germinativas e alta variabilidade genética (MOURA, 2013), quando o cultivo das sementes é realizado em campo apresenta certas limitações para a indústria farmacológica e para a produção de mudas devido a suscetibilidade das plantas à pragas e baixa produção de metabólitos de interesse, como as fisalinas (OLIVEIRA et al., 2013).

Nesse sentido, a cultura de tecidos se constitui numa alternativa para a produção de mudas para atender o mercado de plantas e especialmente a indústria farmacêutica, que demandam por plantas livres de patógenos, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com maior probabilidade de produzir altas concentrações de metabólitos secundários (LIMA et al., 2008; MORAIS et al., 2012). Estudos realizados com espécies do gênero *Physalis* demonstraram que as técnicas de cultura *in vitro* são opção para a produção de mudas de *P. angulata* (KUMAR et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA, 2011; RAMASUBBU, 2009; VIDAL, 2008), *P. pubescens* (BERTONCELLI; OLIVEIRA, 2010), *P. minima* (AFROZ

et al., 2009), *P. alkekengi* (MUNIZ et al., 2015) e *P. ixocarpa* (GARCÍA-OSUNA et al., 2015; KHAN; BAKHT, 2015). Para *P. peruviana* há relatos de estudos com germinação de sementes *in vitro* (MOREIRA et al., 2010) multiplicação *in vitro* (CHAVES et al., 2005; LUIS, 2016; RAMAR et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013; YÜCESAN et al., 2015), e produção de sementes sintéticas a partir de segmentos nodais (YÜCESAN et al., 2015); porém em virtude das variações nas respostas obtidas por esses autores, faz-se imprescindível ajustes nos protocolos existentes, de forma a assegurar uma propagação mais eficiente e com alto teor de metabólitos secundários.

A cultura de tecidos vegetais constitui-se de um conjunto de técnicas direcionadas, principalmente, a propagação, conservação de plantas e produção de metabólitos secundários (RAMAR et al., 2014). Uma das técnicas mais práticas e de maior impacto na cultura de tecidos é a micropropagação e pode ser desenvolvida através da organogênese ou embriogênese, as quais ocorrem por duas vias distintas: a indireta e a direta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na organogênese indireta o explante é induzido à formação de calo com posterior regeneração de gemas adventícias (PINHEIRO et al., 2009), enquanto na via direta há o desenvolvimento de gemas diretamente do tecido do explante que apresenta capacidade morfogênica (ARENHART; ZAFFARI, 2008). É importante que essas vias de desenvolvimento sejam monitoradas histologicamente de modo a evidenciar a rota seguida por cada explante.

Os principais argumentos a favor da micropropagação são a obtenção de maior número de plantas em tempo e espaço reduzido, com qualidade fitossanitária, homogeneidade das mudas e a alta fidelidade genética (CARVALHO et al., 2013; SANTOS-SEREJO et al., 2013).

Quatro etapas básicas constituem a micropropagação: o estabelecimento, a multiplicação, o enraizamento e a aclimatização. Considerando a complexidade do processo morfogênico, o qual envolve fatores como genótipo, fonte e condições fisiológicas do explante, meio de cultura, pH, luminosidade e combinação de reguladores vegetais (MENEGHETTI, 2015), o sucesso de cada etapa dependerá do estabelecimento de protocolos específicos.

O ambiente *in vitro* constitui-se em uma condição atípica ao desenvolvimento do vegetal, no qual estímulos químicos e físicos podem resultar em modificações na parte funcional de genes (FRANÇA, 2001). Isso pode gerar alterações nos teores de clorofila produzidos, uma vez que modificações na luminosidade afetam diretamente as taxas de clorofila e suas frações *a* e *b* produzidas (WHATLEY; WHATLEY, 1982). Outros fatores,

como a adição da fonte de carboidrato ao meio, baixa concentração de CO<sub>2</sub> também limitam a capacidade fotossintética (DECCETTI et al., 2008). Nesse sentido, a quantificação dos teores de clorofila produzidos em diferentes ambientes é essencial para averiguar a capacidade das plantas cultivadas *in vitro* de manter ou alterar os pigmentos fotossintéticos e entender os ajustes que ocorrem nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos para adaptar-se às condições ambientais as quais são expostas.

O ambiente *in vitro* pode alterar o metabolismo primário e conseqüentemente gerar um espectro de compostos do metabolismo secundário que pode diferir daqueles originados na planta-matriz (CARDOSO, 2009), o que oportuniza a investigação de alterações na composição química de certas espécies vegetais. Assim, estudos bioquímicos são requeridos para verificar de que forma o perfil fitoquímico é modificado quando submetidos a ambientes distintos.

Vislumbrando a utilização da cultura de tecidos para a produção de mudas de *P. peruviana* como alternativa para produtores de pequenas frutas, e o aumento do teor de metabólitos secundários de interesse medicinal, objetivou-se com esse trabalho: (1) avaliar os efeitos do BAP no potencial morfogênico de *P. peruviana*, (2) verificar o potencial organogênico a partir de diferentes explantes (3) constatar histologicamente a via de regeneração dos brotos, (4) analisar o enraizamento e a aclimatização das microplantas (5) comparar as plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação quanto aos metabólitos primários e secundários.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Solanaceae

A família Solanaceae, uma das mais representativas entre as angiospermas, compõe-se de um grupo monofilético com aproximadamente 100 gêneros e 2500 espécies (OLMSTEAD; BOHS, 2006) distribuídas por todos os continentes, principalmente em regiões tropicais e temperadas, onde abrange maior biodiversidade no hemisfério Ocidental (OLMSTEAD et al., 2008). O mais provável centro de origem da família e riqueza de espécies é a América Central e do Sul (D'ARCY, 1991). No Brasil há uma grande representatividade, com 34 gêneros e 449 espécies, sendo 215 destas exclusivas do país (STEHMANN et al., 2010).

Muitas descobertas importantes para a ciência, na área farmacêutica e medicinal foram conseguidas em plantas desta família (KAZI, 2015), devido à presença de metabólitos polioxigenados que fornecem substâncias ativas, como os da classe dos vitaesteróides predominante na família e destacando-se no gênero *Physalis* (TOMASSINI, 2000), tanto pela sua produção quanto pela ação anti-inflamatória (WUBE et al., 2008) e imunossupressora (SOARES et al., 2003).

A família Solanaceae inclui espécies economicamente importantes na alimentação, como é o caso da batata (*Solanum tuberosum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), tamarilho (*Solanum betaceum* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (GIACOMINI, 2010); no uso industrial como o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e ornamental, especialmente as espécies dos gêneros *Petunia* e *Brunfelsia*; e ainda diversas espécies com potencial medicinal e nutracêutico usadas em programas de melhoramento genético pela presença de alcaloides e outros compostos químicos (PONCE et al., 2003).

#### 2.1.1 Gênero *Physalis*

O gênero *Physalis* foi estabelecido por Linnaeus em 1753 e contém aproximadamente 100 espécies. Sua nomenclatura é procedente do grego “*physa*” e significa bolha ou bexiga, em alusão ao cálice que protege seus frutos (TOMASSINI et al., 2000).

Sua importância econômica em virtude de suas propriedades nutracêuticas, medicinal, farmacológica, alimentícia e ornamental vem atraindo cada vez mais países consumidores. Embora seja um gênero ainda pouco estudado no meio científico, vem ocupando lugar de

destaque na família pela presença de metabólitos polioxigenados, os vitaesteróides, e por incluir uma ampla variedade de plantas que são econômica e farmacologicamente importantes (TOMASSINI et al., 2000).

Em função do potencial atribuído ao gênero, a comunidade científica vem ampliando os esforços no sentido de melhorar a produção das culturas desenvolvendo pesquisas em áreas como genética molecular e melhoramento de plantas, cultura de tecidos, fitoquímica, identificação e exploração de metabólitos secundários (BONILLA; ESPINOSA, 2003). Esse gênero inclui várias espécies, entre as quais a *Physalis peruviana* L. destaca-se por ser a mais importante economicamente (MOURA, 2013).

### 2.1.2 *Physalis peruviana* L.

A *Physalis peruviana* L. é considerada uma planta anual, que tem crescimento inicialmente herbáceo e se torna um arbusto perene e semilenhoso a partir do segundo ano (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN, 2014); é rústica, com ramificações muito densas, ramos decumbentes e cresce de 1,0 a 2,0 metros de altura (RUFATO et al., 2008). Possui uma raiz fibrosa, que alcança mais de 60 centímetros de profundidade e talos de coloração verde e suave textura. Suas folhas são aveludadas, triangulares e com disposição alternada. As flores são hermafroditas, com cinco sépalas e uma corola amarela e tubular. O fruto, contendo de 100 a 300 sementes, constitui-se de uma baga carnosa, de forma globular, medindo 1,25 e 2,5 cm e pesando entre 4 e 10 gramas, o qual é coberto pelo cálice, responsável por protegê-lo contra insetos, pássaros, patógenos e condições climáticas adversas (RUFATO et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2007; VILLEGAS, 2009) (Figura 1).

A espécie é uma frutífera originária da América do Sul, atualmente comercializada em países tropicais e subtropicais. A Colômbia é o maior produtor mundial da espécie, exportando-a para países da Europa como Holanda, Alemanha, França, Suécia e Grã-Bretanha (MADRC, 2007) e para o Brasil, pois embora no país ocorra o cultivo da espécie, a produção para fins comerciais ainda é incipiente e limitada aos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LIMA et al., 2013), à região da Serra da Mantiqueira, em São Paulo e, no Sul de Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2012), o que faz o país importá-la a preços elevados (RODRIGUES et al., 2009) (Figura 2).

No Brasil, a espécie comumente conhecida como “capa groselha”, “uchuva” (RUFATO et al., 2008), e “tomate de capote” (SILVEIRA et al., 2012), foi estudada pioneiramente em

1999, pela Estação Experimental de Santa Luzia, em São Paulo (MEZZALIRA, 2013; RUFATO et al., 2008). Entretanto, a expansão da cultura se deu no Sul do país e várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas, desde 2006 na Universidade Federal de Santa Catarina e na Universidade Federal de Pelotas (RUFATO et al., 2008), no intuito de potencializar o desenvolvimento da cultura e tornar o Brasil um exportador da fruta (FISCHER; ALMANZAMERCHÁN, 2014; MUNIZ et al., 2012).

Em virtude da potencialidade nutricional, esta espécie vem sendo incorporada ao cultivo de “pequenas frutas” (CHAVES et al., 2005), despertando o interesse de consumidores e produtores de pequeno e médio porte. O termo “pequenas frutas” refere-se ao grupo de espécies consagradas nos países produtores e às recentemente inseridas, cuja cultura requer muito labor e retorno econômico em áreas pequenas de cultivo em curto período (PAGOT; HOFFMANN, 2003).

Pela versatilidade no consumo, seja *in natura*, desidratado, ou no preparo de diversos pratos como doces, geleias, sucos e melaços, o fruto tem atraído atenção de diversos mercados consumidores no Japão, Europa e Brasil (VILLEGAS, 2009). Além disso, possui alto teor de ácido ascórbico, vitamina A, ferro, fósforo, fisalinas A, B, D e F, glicosídeos, fitaesteróis, vitanolídeos, carotenoides e compostos fenólicos, o que lhe confere propriedades medicinais (CHAVES, 2006; LIMA, 2009, PUENT et al., 2011; VELASQUEZ et al., 2007).

Segundo a Corporação Colombiana Internacional (1994), o fruto tem sido ingerido para purificar o sangue, diminuir a albumina nos rins, aliviar problemas na garganta, próstata e bronquíolos, além de fortificar o nervo óptico, melhorar catarata e prevenir a osteoporose. O extrato das suas folhas vem sendo utilizado pelas suas propriedades anticancerígena, antibacteriana, antipirética, diurética e no tratamento de doenças como asma, hepatite, dermatite e artrite (MOURA, 2013; MUNIZ et al., 2015).

Na medicina popular brasileira, seu uso tem por finalidade purificar o sangue, fortalecer o sistema imunológico, suavizar dores de garganta, reduzir colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e melhorar os sintomas do Mal de Parkinson, e no Nordeste brasileiro, vem se destacando em tratamentos caseiros para reumatismo, problemas renais, de bexiga e do fígado e ainda como sedativa e antifebril (MUNIZ et al., 2015).

Mesmo com muitas expectativas sobre o seu potencial de utilização, ainda há carência de estudos de propagação para aumentar a taxa proliferativa da espécie, e de estudos bioquímicos e fitoquímicos que visem potencializar a produção de maior teor de metabólitos secundários de interesse.

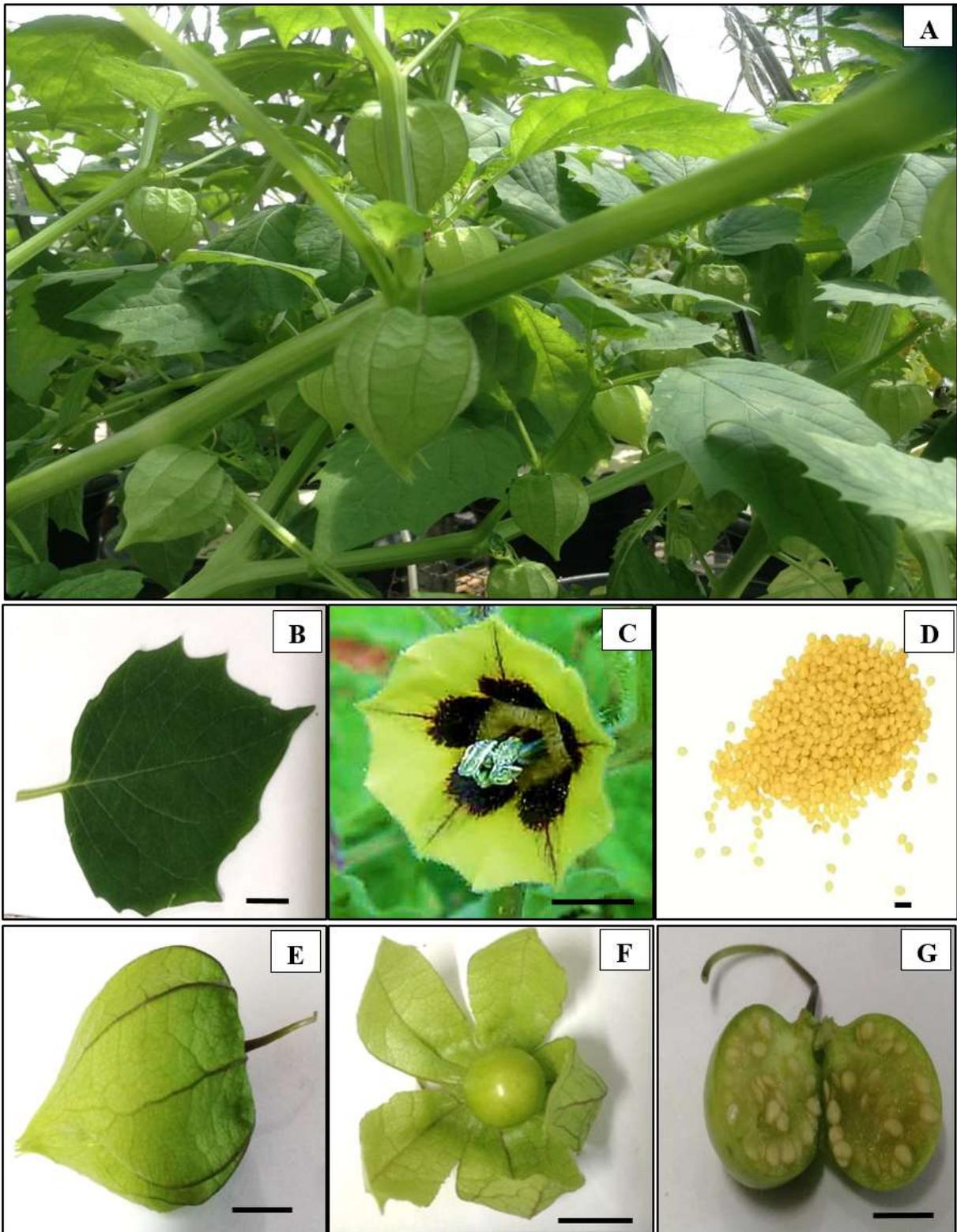


Figura 1. *Physalis peruviana* L. cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS (A). Aspecto da folha (B). Flor (C). Sementes (D). Frutos (E, F, G). Barra: 1 cm (B, C, E, F, G) e 0,2 cm (D). Fonte: Autora (2017).



Figura 2. Mapa de distribuição geográfica da *Physalis peruviana* L.  
 Fonte: Adaptado de MELO (2012).

#### 2.1.2.1 A *Physalis peruviana* e a produção de metabólitos secundários

As plantas sintetizam uma série de componentes orgânicos que compõem os metabólitos primários e secundários. Os primários estão associados à função estrutural, plástica e de armazenamento de energia; os secundários, aparentemente não possuem relação com o crescimento e o desenvolvimento, mas atuam aumentando o desempenho reprodutivo das plantas ao agirem na adaptação, interação e sobrevivência da espécie no ambiente, especialmente na defesa contra patógenos (SIMÕES et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários são produzidos em pequenas quantidades e restritos a uma espécie ou grupo de plantas, expressando sua individualidade. A biossíntese desses compostos se dá por meio de interações químicas entre a planta e o ambiente, assim, alterações nas condições ambientais podem favorecer ou reduzir sua produção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As três principais classes de metabólitos secundários são os terpenos, os compostos fenólicos e os componentes contendo nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2013) e são originados pelo metabolismo da glicose por intermédio de dois precursores principais, o ácido chiquímico e o acelato (SANTOS, 2004).

Diversos metabólitos secundários, usados na medicina e indústria farmacêutica, foram encontrados no gênero *Physalis*, como os flavonoides e vitaesteróides, a partir de estudos científicos realizados com extratos de folhas, raízes e frutos (CHAVES et al., 2005; TOMASSINI et al., 2000). Entre os principais vitaesteróides encontram-se as fisalinas, no qual esse gênero, destaca-se na família como o maior produtor dessa substância (TOMASSINI et al., 2000).

Na *P. peruviana*, as fisalinas são encontradas em maior quantidade em raízes e folhas, e se destaca pela sua citotoxicidade e propriedades farmacológicas (MOURA, 2013; SOARES et al., 2003), por atuar no sistema imunológico humano, evitar a rejeição de órgãos transplantados, reduzir o colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade), diminuir os índices glicêmicos e ter ação diurética (MOURA, 2013; RUFATO et al., 2008). Pesquisas desenvolvidas pela Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro e em Salvador tem demonstrado inúmeras atividades biológicas das fisalinas e evidenciado a ação anti-inflamatória em até 30 vezes mais eficácia que os compostos já conhecidos (OLIVEIRA et al., 2013; TOMASSINI et al., 2000).

Além disso, a adaptabilidade e desenvolvimento de *P. peruviana* numa ampla variedade de habitats, clima e solo (FISCHER, 2000; LANNA et al., 2013), justificada sobretudo pela alta diversidade, valor agregado, potencial nutracêutico, possibilidade de incorporação nos cultivos orgânicos (LANNA et al., 2013; VELASQUEZ et al., 2007) e pelo seu aproveitamento quase em sua totalidade, viabiliza um rápido retorno financeiro (SILVEIRA et al., 2012) e se constitui em uma excelente alternativa para a comercialização no mercado nacional e internacional.

O significativo potencial de utilização de *P. peruviana* associado à limitação de sua propagação por métodos convencionais, especialmente no que tange a propensão a pragas e reduzida produção de metabólitos secundários, torna necessário o estabelecimento de sistemas alternativos de propagação da espécie (SOUZA et al., 2013).

Nesse sentido, a cultura de tecidos vem sendo testada em diversas espécies medicinais proporcionando a produção em larga escala de mudas, bem como a potencialização da produtividade de compostos secundários de interesse do ponto de vista terapêutico (LIMA et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

## **2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica na qual pequenos fragmentos de um tecido vivo são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente em meio

nutritivo, em condições apropriadas para reconstruir todo o organismo (ANDRADE, 2002). Essa técnica constitui-se numa ferramenta promissora para estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro*, possibilitando a obtenção de variedades melhoradas, produção de compostos bioativos, plantas livres de patógenos, exploração controlada e independente das variações ambientais proporcionando a conservação de germoplasma (CARVALHO et al., 2013; PEREIRA, 2011).

Dentre as diversas práticas de cultura de tecidos, a micropropagação vem se destacando para propagação de diversas espécies vegetais e oferece vantagem pelas altas taxas de multiplicação e rapidez com que o processo ocorre, o controle das condições de cultivo, a propagação contínua e asséptica num espaço e tempo reduzido em qualquer época do ano, além de favorecer a regeneração de plantas que não se propagam facilmente por métodos convencionais (GUERRA; NODARI, 2016).

A micropropagação pode ser dividida nas etapas de estabelecimento *in vitro*, multiplicação, enraizamento e aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A etapa inicial consiste em estabelecer o explante e o meio de cultura mais apropriado e o melhor método de desinfestação para o tecido selecionado, para evitar contaminações bacterianas e fúngicas, o que comprometeria os estágios subsequentes (BORGES et al., 2004; COSTA et al., 2010).

Na multiplicação as partes formadas são subdivididas em partes menores ou individualizadas para formação de novos explantes (BOMFIM, 2006). Essa etapa consiste em potencializar a capacidade do explante produzir brotos de qualidade fitossanitária, em um menor tempo possível (CHAVES et al., 2005; ERIG; SCHUCH, 2005). Quando os brotos formados são pequenos, uma etapa de alongamento anterior a de enraizamento é indicada para possibilitar maior individualização destes e reduzir o tempo de cultivo *in vitro* (LIMA-BRITO et al., 2016).

Fatores como genótipo, tipo de explante, condição fisiológica e combinação de reguladores vegetais são determinantes para o sucesso da micropropagação (LUCIANI et al., 2006). Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios vegetais (CID; TEXEIRA, 2010) e se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*, independente da rota de regeneração (MOURA et al., 2001).

Entre os reguladores, as citocininas e as auxinas são os mais utilizados na organogênese (PERES, 2002) e são adicionados para suprir as carências endógenas do explante excitando

respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), promovendo resultados eficazes quando utilizados em concentrações adequadas.

As citocininas são as mais indicadas para quebrar a dominância apical, regular a divisão celular das partes aéreas, induzir as gemas axilares e promover o crescimento de gemas laterais (FLORES et al., 1998). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) tem se mostrado eficaz na propagação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultura (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Os trabalhos *in vitro* realizados para o gênero *Physalis* mostraram que o BAP é o regulador mais utilizado na regeneração de brotos.

Os reguladores vegetais influenciam diretamente tecidos ou órgãos, com distintos graus de determinação, a adquirir novas competências, influenciando na expressão morfogênica dos genes em dois níveis: organogênese e embriogênese somática (GUERRA; NODARI, 2016).

De acordo com Andrade (2002), a organogênese é uma via de desenvolvimento na qual os órgãos vegetais são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células que manifestam sua totipotencialidade diretamente ou indiretamente; a modulação dessa via dependerá do tipo e concentrações de reguladores vegetais utilizados. Assim, em geral, concentrações elevadas de citocininas e auxinas promovem, respectivamente, a cauligênese e rizogênese, enquanto o equilíbrio entre os dois reguladores induz à calogênese (GUERRA; NODARI, 2016).

A organogênese direta é a regeneração de plantas a partir de tecidos meristemáticos, sem passagem pela fase de calo, enquanto a organogênese indireta ocorre quando a multiplicação das gemas é precedida pela formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para estes autores, há um maior sucesso com o uso de explantes com maior proporção de tecido meristemático ou com maior capacidade de expressar a totipotência.

Na organogênese direta, a proliferação das gemas ocorre sem a desdiferenciação dos tecidos dos explantes (GUERRA; NODARI, 2016), tornando-o um eficiente método para obtenção de plantas geneticamente estáveis e idênticas à planta mãe, o que é economicamente viável, pois assegura a uniformidade de culturas de interesse comercial (LIMA-BRITO, 2009) ao mesmo tempo em que mantém características morfológicas desejáveis.

Na organogênese indireta, ao contrário da direta, ocorre uma etapa de desdiferenciação, seguida por uma reprogramação celular (rediferenciação) para a formação dos novos tecidos e órgãos (GUERRA; NODARI, 2016), o que representa vantagens quando se deseja aumentar

taxa proliferativa da espécie e o melhoramento genético devido ao potencial de variabilidade genética associado à formação de calos (NIKAN; SHITOLE, 1999).

Nem sempre é possível distinguir a vias organogênicas direta e indireta em um explante, pois podem ocorrer simultaneamente para o mesmo tecido. Neste caso, uma análise anatômica é fundamental para determinação precisa da rota a qual o broto originou-se e identificar o tipo de célula morfogeneticamente responsiva (MELLO et al., 2000).

A etapa de enraizamento se dá por meios de fatores intrínsecos ao explante, ou extrínsecos como o tipo de meio e o tipo e concentrações de auxinas utilizadas, às quais são responsáveis por estimular a divisão celular (CID; TEIXEIRA, 2010; LEITZKE et al., 2009). Entretanto, muitas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam em meio de cultura isento de reguladores vegetais (GRATTAPAGLIA; CALDAS, 1987).

O carvão ativado é uma substância que tem surtido um efeito positivo na etapa de enraizamento dos brotos *in vitro* por reproduzir uma condição de escuro, na qual as raízes adventícias normalmente se desenvolvem e melhorar o crescimento e o desenvolvimento das células submetidas a essas condições (MOSHKOV et al., 2008; VIEITEZ et al., 2009). Seu efeito favorável está na alta capacidade de adsorção a substâncias tóxicas, como fenóis e/ou quinonas, muitas vezes produzidas na autoclavagem ou liberadas de explantes cujos tecidos sofreram danos, além de alterar a composição e o pH do meio de cultivo, aperfeiçoando o crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; THOMAS, 2008).

A aclimatização é a transferência da planta da condição *in vitro*, onde há limitações de luz e CO<sub>2</sub> e elevada taxa de carboidrato disponível, e conseqüentemente reduzidas taxas de transpiração e fotossíntese, para a condição *ex vitro*. Esta etapa é limitante à micropropagação e implica em altos índices de mortalidade, decréscimo na taxa de crescimento e desuniformidade das mudas micropropagadas (LIMA-BRITO et al., 2016; SILVA et al., 2011).

O estresse hídrico, consequência de maior demanda na taxa de transpiração, ausência ou redução na cutícula, mesófilo pouco desenvolvido e estômatos pouco funcionais é a principal barreira à conversão das plantas do estado heterotrófico (*in vitro*), para o estado autotrófico (*ex vitro*) (BARBOZA et al., 2006; LIMA-BRITO et al., 2016). Assim, esta etapa requer acompanhamento das plantas micropropagadas a fim de reduzir o estresse causado pelas diferenças entre as condições ambientais.

### 2.2.1 Cultura de tecidos vegetais e o gênero *Physalis*

Diversos estudos têm sido relatados na literatura com a aplicação da cultura de tecidos envolvendo a micropropagação via organogênese para o gênero *Physalis*. Considerando a etapa de estabelecimento, diferentes meios e concentrações de sais foram testados para as espécies *P. angulata* e *P. peruviana*. Para *P. angulata* os resultados demonstraram que os meios de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), e MS ½ (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foram mais adequados para o desenvolvimento inicial das plântulas a partir de sementes, sendo recomendados para as demais etapas da micropropagação da espécie (OLIVEIRA et al., 2013).

Para a *P. peruviana*, o meio de cultura indicado para a etapa de estabelecimento é o MS. Luis (2016) obteve altas taxas germinativas (96,6%) em meio MS completo, enquanto Moreira (2010) e Chaves et al. (2005) observaram as maiores médias para a porcentagem de germinação em meio MS ¾, 100% e 22,90%, respectivamente.

Considerando a etapa de multiplicação, apesar de Moura et al. (2016) e Vidal (2008) relatarem que os reguladores vegetais são dispensáveis para indução de brotos adventícios em *P. angulata*, outros autores testaram o efeito dos reguladores isolados ou em associações obtendo resultados positivos para as espécies *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. minima*, *P. pubescens* e *P. peruviana* cultivadas em meio MS. Os melhores resultados relatados nestes estudos são apresentados na Tabela 1.

Na etapa de enraizamento, Vidal (2008) e Contreras e Almeida (2003) observaram o enraizamento em *P. angulata* e *P. ixocarpa*, respectivamente e obtiveram 100% de enraizamento para essas espécies em meio isento de regulador vegetal.

A etapa de aclimatização foi testada para as espécies *P. peruviana* (LUIZ, 2016), *P. alkekengi*, *P. minima* (MUNIZ, 2013) e *P. angulata* (PEREIRA, 2011), com taxas de sobrevivência de 100%, o que indica o sucesso da micropropagação para as espécies estudadas.

Além dos estudos de organogênese para as espécies do gênero *Physalis*, experimentos para obtenção de embriões somáticos foram realizados por Pereira et al. (2006) para *P. angulata*, no qual massa celular embriogênica foi verificada em explantes cultivados com 15 e 20 µM de 2,4-D ocorrendo a regeneração de alguns embriões. Já nos tratamentos onde se utilizou picloran, os autores observaram a formação de calos friáveis.

Embora as pesquisas realizadas ofereçam boas perspectivas para nortear os posteriores trabalhos de micropropagação com a espécie *P. peruviana*, torna-se relevante novos estudos para ampliar os conhecimentos sobre o comportamento *in vitro* da espécie, avaliar a taxa de metabólitos secundários produzidos *in vitro* e minimizar as contradições existente na literatura,

de modo que se possa aprimorar os protocolos de micropropagação da espécie desenvolvidos até então.

Tabela 1. Estudos com a multiplicação em espécies do gênero *Physalis*.

<b>Espécies</b>	<b>Regulador vegetal</b>	<b>Variáveis com melhores resultados</b>	<b>Autores</b>
<i>P. angulata</i>	-	NB e CB	Moura (2016)
	-	NB e CB	Vidal (2008)
	BAP: 4,44 µM	NB	Kumar (2009)
	CIN: 23,25 µM	CB	Oliveira (2013)
	BAP: 4,44 µM	CB	Ramasubbu (2009)
	CIN: 4,44 µM	NB	Ramasubbu (2009)
<i>P. minima</i>	BAP: 4,44 µM	NB	Ramasubbu (2009)
	BAP: 8,88 µM	NB	Afroz et al. (2009) Jahirhussain et al. (2016)
	BAP: 8,88 µM	NB	Sheeba et al. (2010)
	BAP x ANA (13,32 µM x 2,68 µM)	NB e CP	García –Osuma et al. (2015)
<i>P. ixocarpa</i>	BAP x ANA (2,68 µM x 4,88 µM)	NB e CB	Khan e Bakht (2015)
	BAP: 2,22 µM	NB	Khan e Bakht (2015)
<i>P. pubescens</i>	BAP x ANA (2,22 µM x 1,34 µM)	CALOS	Bertoncelli e Oliveira (2010)
<i>P. peruviana</i>	BAP: 1,33 µM	NB	Chaves et al. (2005)
	BAP: 5,77 µM	NB	Rodrigues et al. (2013)
	BAP: 5,32 µM	NB	Muniz (2013)
	2,27 µM de BAP	NB	Yücesan et al. (2015)
	13,32 µM de BAP x 2,89 µM de GA3 x 4,53 µM de 2,4-D	NB	Ramar et al. (2014)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento das plantas *in vitro*, foram utilizadas sementes secas de *Physalis peruviana* L. oriundas do Laboratório de Germinação da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na mesma instituição.

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com imersão em etanol a 70% por 30 segundos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio – NaOCl (2,5% de cloro ativo), acrescido de duas gotas de detergente, por 15 minutos. Após esse período, as sementes foram lavadas 4 vezes com água destilada estéril para total remoção do cloro e, em seguida, semeadas em frascos com capacidade para 250 mL contendo 60 mL de meio nutritivo suplementado com 30gL<sup>-1</sup> de sacarose e gelificados com 7gL<sup>-1</sup> de ágar. O meio de cultura utilizado foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,0 atm de pressão, após o ajuste do pH para 5,8 utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo utilizado o meio MS com três concentrações salinas: MS completo, MS  $\frac{3}{4}$  (reduzido em 25% dos sais) e MS  $\frac{1}{2}$  (reduzido em 50% dos sais). Cada tratamento foi composto de cinco repetições com quatro amostras cada.

A germinação foi avaliada diariamente considerando-se como germinadas as sementes que emitiram a radícula. Ao final de 30 dias avaliou-se o total de sementes germinadas.

#### 3.2 Multiplicação

##### 3.2.1 Efeito do tipo de explante e do BAP na morfogênese

Após estabelecer o meio de cultura mais adequado para o cultivo da *P. peruviana*, foi avaliado o potencial morfogênico da espécie. Foram utilizados seis tipos de explantes: cotilédone, folha, nó cotiledonar, epicótilo, hipocótilo e raiz, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, derivados de plantas germinadas *in vitro*, com 30 dias de idade (Figura 3). Os explantes foram individualizados em câmara de fluxo laminar, suas extremidades foram excisadas e posteriormente foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL do meio MS  $\frac{1}{2}$  acrescidos de 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 7 gL<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações

do regulador vegetal BAP (0,00; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88  $\mu\text{M}$ ). Os explantes foram inoculados na posição horizontal sobre a superfície do meio (um explante por tubo).

Aos 30 dias de montagem do experimento foram avaliados a porcentagem de explantes com calos, a área do explante coberta com calo (25%, 50%, 75% e 100%), o número de brotos obtidos por organogênese indireta, o número de brotos obtidos por organogênese direta e a porcentagem de explantes responsivos a formação de brotos por organogênese indireta e direta.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6 x 5 (tipo de explante, concentração de BAP). Cada tratamento foi composto por cinco repetições com quatro amostras cada.

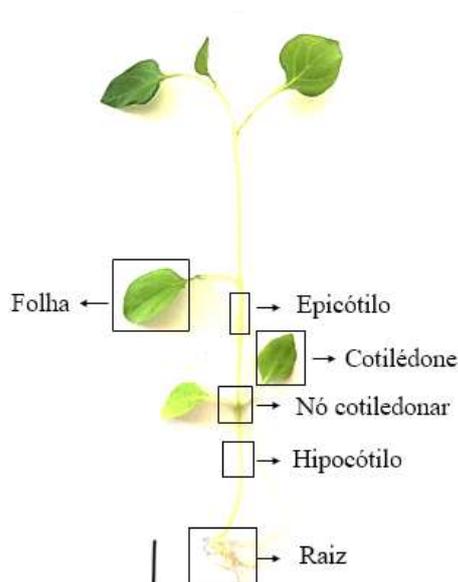


Figura 3. Morfologia da *Physalis peruviana* L. aos 30 dias da germinação *in vitro*. Barra: 1 cm. Fonte: Autora (2017).

### 3.2.2 Multiplicação via organogênese direta

A fim de aumentar a taxa de regeneração via organogênese direta, um novo experimento foi montado obedecendo ao método descrito no item 3.2.1 utilizando o explante nó cotiledonar submetido às seguintes concentrações de BAP: 0,00; 4,44; 8,88; 13,32; 17,76 e 22,20  $\mu\text{M}$ , sendo os explantes inoculados na posição horizontal sobre a superfície do meio (um explante por tubo). Aos 30 dias de montagem do experimento foram avaliados o número de brotos por explante e a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos via organogênese direta.

O experimento foi feito em delineamento experimental inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por cinco repetições com quatro amostras cada.

### 3.2.3 Multiplicação via organogênese indireta

Os explantes foliares, oriundos de plantas *in vitro* com 30 dias de idade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  acrescido da concentração 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP que apresentou os melhores resultados no experimento 3.2.1.

Após 30 dias de cultivo, calos com brotos oriundos da regeneração via organogênese indireta, foram excisados do explante e inoculados em meio desprovido de regulador, onde permaneceram por 30 dias para alongamento dos brotos.

### 3.3 Enraizamento *in vitro*

Com base nos resultados do experimento anterior, segmentos nodais oriundos de plantas com 30 dias de idade foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  (Figura 4). Após 30 dias de cultivo os brotos obtidos via organogênese direta foram individualizados e inseridos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Após 30 dias de cultivo foi avaliada a porcentagem de microplantas com raiz.

Foram utilizados dois tratamentos de enraizamento: meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  e meio MS  $\frac{1}{2}$  suplementado com 1  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativo (Figura 4). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 5 tubos.

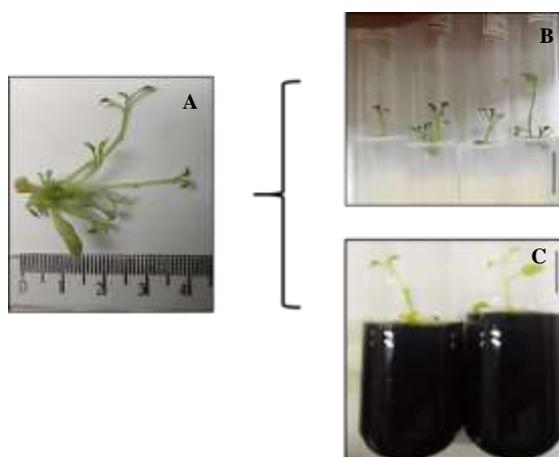


Figura 4. *Physalis peruviana* L. Brotos oriundos do segmento nodal em 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP (A). Enraizamento em meio MS  $\frac{1}{2}$  sem carvão ativo (B). Enraizamento em meio MS  $\frac{1}{2}$  com carvão ativo (C). Feira de Santana - BA, 2017. Fonte: Autora (2017).

### 3.4 Aclimatização

As microplantas provenientes do enraizamento *in vitro* tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remoção do excesso de meio de cultura e posteriormente foram transplantadas em copos plásticos transparentes, com capacidade para 500 mL, contendo os substratos: terra vegetal + vermiculita (2:1) ou terra vegetal.

Após o transplântio, 50% das microplantas foram cobertas por copos plásticos transparentes para manter a umidade relativa do microambiente e 50% permaneceram expostas diretamente ao ambiente da casa de vegetação. As unidades experimentais foram dispostas em bandeja plástica com uma lâmina de água (500mL), cuja reposição era realizada conforme necessidade, e mantidas em casa de vegetação a 70% de luminosidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 x 2 (substratos x tipos de proteção), totalizando quatro tratamentos cada um compostos por 5 repetições de 3 amostras cada (Tabela 2. Figura 5).

A porcentagem de sobrevivência das microplantas foi avaliada aos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 dias, após a transferência para a condição *ex vitro*.

Tabela 2. *Physalis peruviana* L. aclimatizadas sob diferentes substratos e microambientes em casa de vegetação. Feira de Santana – BA, 2017.

Tratamento	Substrato	Microambiente
1	Terra vegetal + vermiculita	Sem proteção
2	Terra vegetal + vermiculita	Com proteção*
3	Terra vegetal	Sem proteção
4	Terra vegetal	Com proteção*

\*Plantas cobertas com copos plásticos transparentes.



Figura 5. Aclimatização de *Physalis peruviana* L. Microplantas cultivadas sem proteção (A) e com proteção (B). UEFS/ Horto Florestal, Feira de Santana - BA, 2017. Fonte: Autora (2017).

### 3.5 Condições de cultivo

Para as três primeiras etapas da micropropagação: estabelecimento, multiplicação e enraizamento, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 h e radiação fotossintética ativa de  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  obtidas por lâmpadas brancas fluorescentes, e na etapa de aclimatização e cultivo em casa de vegetação as plantas foram mantidas a 70% de luminosidade.

### 3.6 Análise histológica

Para acompanhar a regeneração de brotos via organogênese direta foram utilizados o segmento cotiledonar cultivado em meio suplementado com  $8,88 \mu\text{M}$  de BAP; e a organogênese indireta foi analisada em explantes foliares, cultivados em  $4,44 \mu\text{M}$  de BAP.

As amostras foram fixadas em FAA70 (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18, v/v) (JOHANSEN, 1940) por 24 horas, a fim de bloquear o metabolismo das células (LOUREIRO et al., 2013). Após fixação, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica crescente (álcool 70, 80, 90 e 100%) por duas horas; pré-infiltração à temperatura ambiente em álcool 100% e resina líquida (1:1) por duas horas e posterior infiltração em resina ativada por 4 horas.

As amostras foram montadas em histomoldes de polietileno 6 x 9 mm contendo resina de inclusão (resina ativada + endurecedor) e, imediatamente levadas à estufa a  $40^\circ\text{C}$  para endurecimento. Os cortes anatômicos foram realizados em micrótomo rotativo (LEICA RM2125RT) obtendo secções transversais do nó cotiledonar e secções longitudinais dos calos foliares, ambos com  $5 \mu\text{m}$  de espessura. Em seguida, os tecidos foram submetidos à dupla coloração (0,1% de safranina e 0,1% de astra azul). Os cortes foram observados e fotografados em fotomicroscópio (LEICA DM500ICC50W).

### 3.7 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram efetuadas no Laboratório de Germinação (LAGER), localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

### 3.7.1 Preparo dos extratos

Os experimentos foram realizados em três tipos de tecidos: folha, caule e raiz, provenientes de plantas com 45 dias de idade cultivadas *in vitro* ou em casa de vegetação. Para compor os extratos, as amostras de cada tecido foram maceradas em almofariz, usando uma alíquota de 2 mL do extrator (tampão fosfato) para cada 200 mg do tecido (NOGUEIRA et al., 2008). As amostras foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante, recolhido em eppendorfs foi armazenado em ultrafreezer para análise posterior.

### 3.7.2 Análise de proteínas solúveis, açúcares solúveis totais e açúcares redutores

Os extratos obtidos dos diferentes tecidos foram utilizados para a quantificação dos teores de proteínas solúveis, determinadas colorimetricamente pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão; dos açúcares redutores (AR), pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959), utilizando a glicose como padrão, e dos açúcares solúveis totais (AST), pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), utilizando o ácido sulfúrico como padrão. Para todas as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições, com três amostras cada.

A leitura das absorvâncias realizada em espectrofotômetro foi determinada usando cuvetes de quartzo em um espectrofotômetro de feixe duplo (FEMTO 800XI) a um comprimento de onda  $\lambda = 595$  nm para proteínas,  $\lambda = 540$  nm para açúcares redutores e  $\lambda = 620$  nm para açúcares solúveis totais.

### 3.7.3 Teor de clorofila

O teor de clorofila total, clorofila *a* e clorofila *b* foi determinado em plantas de mesma idade (45 dias) em sistemas de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação. Com base no método bioquímico, proposto por Arnon (1949), foram efetuadas nove repetições com 1 amostra de 0,2 gramas de matéria fresca das folhas saudáveis e completas de *P. peruviana*, provenientes de cada sistema de cultivo. As amostras foram pesadas e posteriormente maceradas em almofariz com 6 mL de acetona 80%. A suspensão foi filtrada em funil revestido de papel germitest em provetas de 20 mL protegidas da luminosidade por papel alumínio e seu volume completado com acetona 80% até 10 mL. As amostras foram recolhidas em tubos de ensaio e em seguida a

absorbância das amostras foi determinada usando cuvetes de quartzo em um espectrofotômetro de feixe duplo (FEMTO 800XI) a um comprimento de onda  $\lambda=663$  nm (clorofila a) e  $\lambda= 645$  nm (clorofila b). O controle consistiu da solução extratora (Figura 6).

Os cálculos para quantificação da clorofila, com base nos valores da absorbância foram realizados a partir das equações abaixo.

$$\text{Clorofila a (mg.mL}^{-1}\text{)} = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$\text{Clorofila b (mg.mL}^{-1}\text{)} = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68A_{663}$$

$$\text{Clorofila total (mg.mL}^{-1}\text{)} = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02A_{663}$$

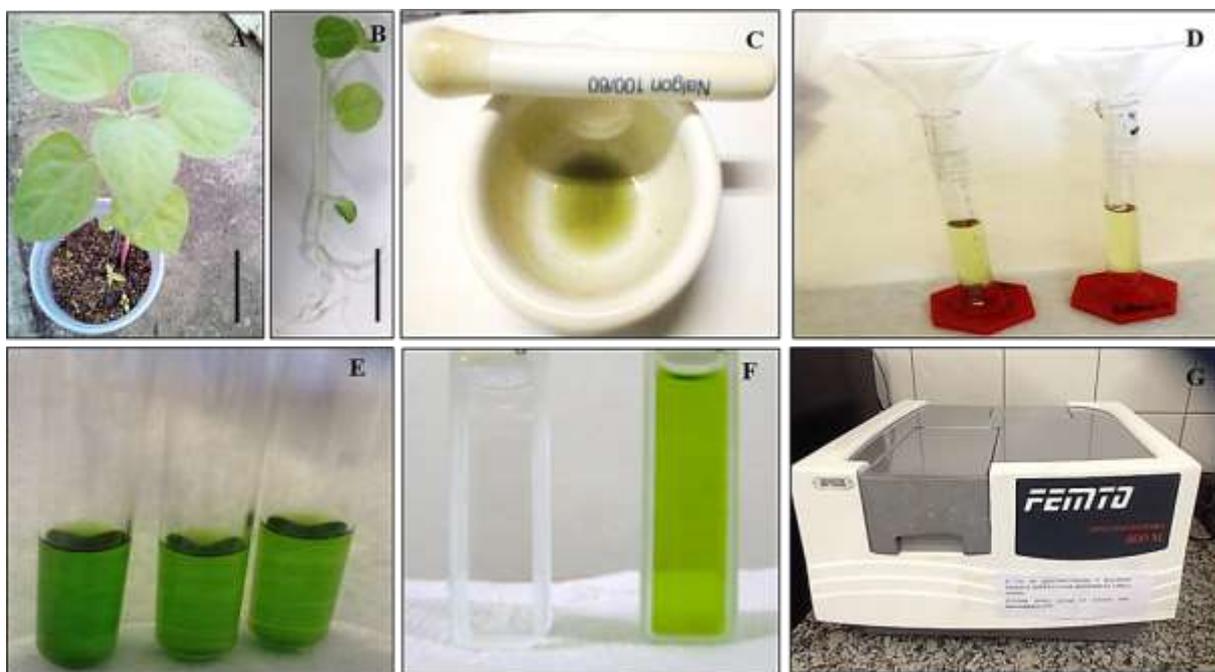


Figura 6. Plantas em casa de vegetação e *in vitro* com 45 dias de idade (A, B). Maceração em acetona (C). Filtração em papel germitest (D). Extrato de clorofila (E). Cuvetes com a solução extratora e o extrato de clorofila (F). Medição da absorbância (G). Barra: 1 cm (A, B). UEFS/ Horto Florestal, Feira de Santana - BA, 2018. Fonte: Autora (2018).

### 3.8 Análise fitoquímica

O preparo dos extratos foi realizado no Laboratório de Extração (LAEX) localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a análise fitoquímica de todas as amostras foi realizada no Laboratório de Bioprospecção Vegetal (LABIV), da mesma instituição.

#### 3.8.1 Obtenção do extrato seco

Explantes de folha, raiz e caule oriundos de plantas com 45 dias de idade, provenientes da germinação *in vitro* e em casa de vegetação e de calos, obtidos a partir do explante folha, foram excisados e submetidos à secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 40°C, por 72 horas e posteriormente, trituradas em almofariz com pistilo. O material seco (1g) de cada amostra foi pesado em balança analítica e sua massa registrada para o cálculo de rendimento, de acordo com a equação  $Re (\%) = (P_{ext} / P_{matveg}) \times 100$ . onde: Re = Rendimento total do extrato (%);  $P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g);  $P_{matveg}$  = Peso do material vegetal fresco (g) (RODRIGUES et al., 2011).

O material seco (1 g) foi submetido a sonicação em sistema de ultrassom por 1 hora, com 30 mL de álcool metílico puro para análise. A solução filtrada foi concentrada por eliminação do solvente orgânico em estufa à 40°C, resultando nos extratos brutos metanólicos da *P. peruviana*, utilizado para triagem fitoquímica qualitativa e para análise do perfil fitoquímico por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Diodos (CLAE-DAD) (Figura 7).

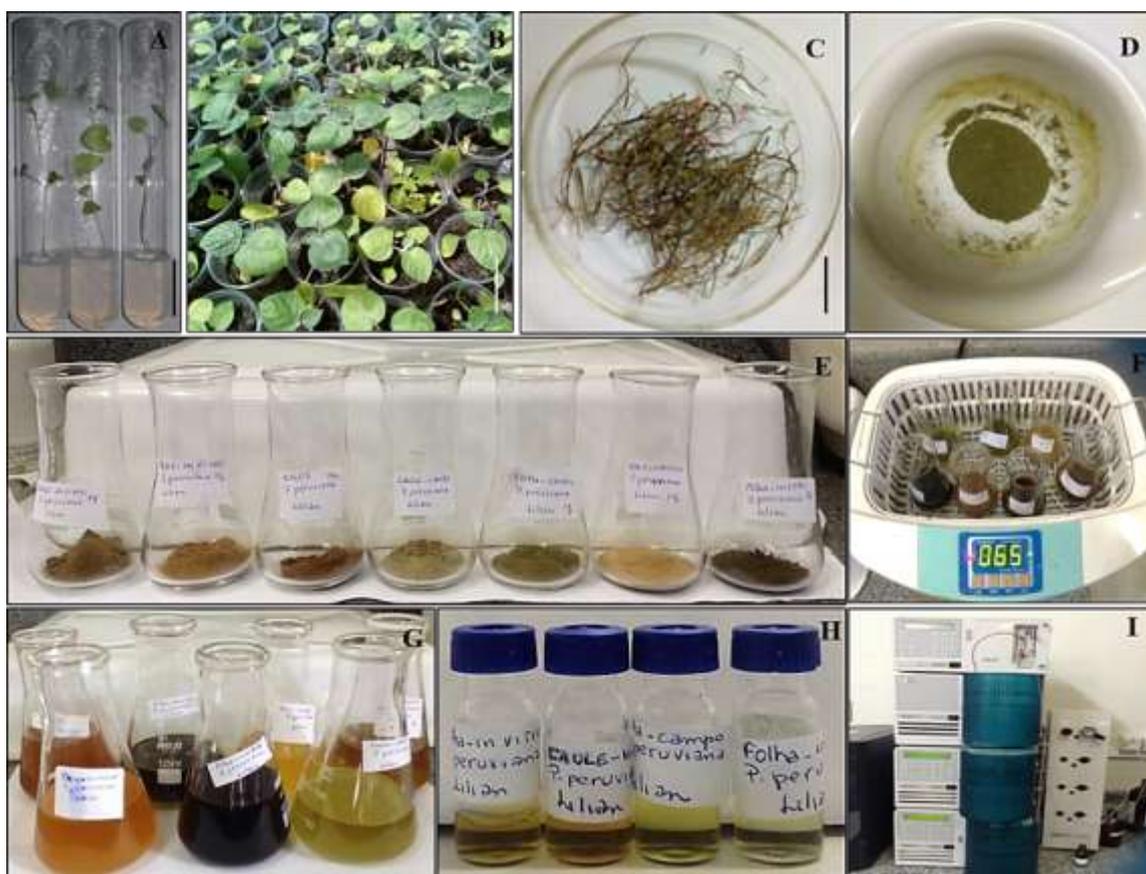


Figura 7. Material vegetal cultivado *in vitro* e em casa de vegetação (A, B). Caule seco (C). Caule triturado (D). Extratos secos de caule, folha, raiz e calos (E). Sonicação em sistema ultrassom (F). Extrato metanólico (G). Preparo para injeção em CLAE (H). Triagem em CLAE (I). Barra: 1 cm (A, B, C). UEFS, Feira de Santana – BA, 2018. Fonte: Autora (2018).

### 3.8.2 Análise de compostos fenólicos utilizando CLAE-DAD

As análises dos extratos de folhas, caules e raízes de *P. peruviana* cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação foram efetuadas em CLAE-DAD a fim de detectar a presença de substâncias fenólicas e para se obter o perfil de UV-Vis dos picos cromatográficos do extrato, através da comparação com padrões comerciais. Os solventes empregados nas análises foram metanol (Sigma-Aldrich®), acetonitrila da Merck®, ácido acético da Vetec® reagente de grau analítico e água purificada em sistema Milli-Q® a 18,2 MΩcm. Os padrões utilizados foram rutina, catequina, procianidina, epicatequina, quercetina, canferol e canferide da Sigma-Aldrich.

Os padrões e os extratos obtidos foram analisados através do sistema Merck-Hitachi LaChrom consistindo de bomba VarianPolaris, detector de arranjo de diodo (DAD) e injetor manual. A separação cromatográfica foi realizada em coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck®, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck®. As análises foram realizadas com tempo total de 41 minutos, a uma temperatura de 25°C e com fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e o monitoramento dos cromatogramas foi realizado em uma faixa de comprimento de onda 210 a 600 nm com aquisição em 280 nm. O gradiente de eluição utilizado para análise dos padrões e extratos foi solução de ácido acético 0,7% (Fase A) e acetonitrila (MeCN) com solução de ácido acético 0,7% na proporção de 8:2 (Fase B).

Para preparo das soluções injetadas, pesou-se 10 mg de cada extrato solubilizando-os em 2 mL do solvente orgânico (Fase B), obtendo-se concentração de 5 mg/mL. As amostras foram filtradas em cartucho de Extração de Fase Sólida (Solid-Phase Extraction -SPE) para remover partículas que pudessem interagir com a coluna cromatográfica. Todas as amostras foram injetadas em triplicata.

A solução padrão de 10 mL, composta pelos 7 padrões de flavonoides foram avaliadas a partir dos tempos de retenção e espectro no UV-vis de cada amostra. A identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção e espectro no UV-vis de cada amostra com os padrões de compostos fenólicos. Para confirmação, os extratos foram enriquecidos com padrões, e após injeção foram avaliados novamente o tempo de retenção e espectro do pico de interesse.

### 3.8.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais por técnica espectrofotométrica

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (FC) (OLIVEIRA et al., 2009; SINGLETON et al., 1965) utilizando ácido gálico como padrão de referência. Foram preparadas a solução-reagente FC em água destilada 1:10, e a solução de carbonato de sódio a 7,5%. Diluiu-se 10 mg dos extratos de *P. peruviana* em solução de 10 mL de metanol.

Uma alíquota de 0,5 mL de ácido gálico e das soluções dos extratos de *P. peruviana* foi transferida para tubos de ensaio e lhe foram adicionados 2,5 mL do reagente FC. Essa solução ficou em repouso por 3 minutos e a ela foi acrescentada 2 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%. As amostras foram aquecidas em banho-maria a uma temperatura de 50°C por 5 minutos e em seguida, resfriadas em banho de gelo por 3 minutos. A reação resultante foi avaliada em Multiskan GO (Skanit software 3.2) em microplacas de 90 poços a um comprimento de onda  $\lambda = 760$  nm.

Após as análises, as absorbâncias foram utilizadas para determinação das concentrações de compostos fenólicos totais expresso em gramas de ácido gálico equivalente a 100 g de extrato (g AGE.100g) (MINUSSI et al., 2003), a partir da curva de calibração do ácido gálico nas concentrações (0,1, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>) e o gráfico foi plotado no Excel.

### 3.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) mediante programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro para os dados qualitativos ou por regressão para os dados quantitativos.

Para a análise fitoquímica, todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação das médias, realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ( $p < 0,05$ ), com auxílio do software Prisma 4.0 (GraphPad).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento *in vitro*

O método para a desinfestação das sementes foi eficiente, uma vez que 100% das unidades experimentais mostraram-se livre de contaminação fúngica e bacteriana, bem como de oxidação, o que pôde ser observado pela transparência dos meios de cultura até o final da etapa de germinação em todos os tratamentos. Um fator preponderante para o sucesso na etapa de estabelecimento *in vitro* é a escolha adequada do método de desinfestação dos explantes, pois embora se constitua num processo simples, é essencial para as etapas sequenciais da micropropagação.

O estabelecimento *in vitro* por meio de sementes é uma alternativa propícia e vantajosa tanto para evitar agressões à planta matriz em seu ambiente natural, quanto pelo sucesso na desinfestação deste explante (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN, 2014). Ademais, a semente apresenta alta variabilidade genética, o que proporciona manutenção da variabilidade superior a outros métodos, sendo indicado para formação de coleção de plantas *in vitro* (BELLINTANI et al., 2007).

Além disso, o estabelecimento de *P. peruviana in vitro* a partir de sementes justifica-se por tratar-se de uma espécie de ciclo curto, e que tem sua reprodução limitada aos dois primeiros anos de vida e por um máximo de quatro anos, desde que se desenvolva um plano de manejo adequado (FISCHER, 2000).

O processo de germinação iniciou-se no quinto dia da inoculação das sementes *in vitro*, para os meios de cultivo MS  $\frac{3}{4}$  e MS  $\frac{1}{2}$ , enquanto para o meio MS a germinação iniciou-se no sétimo dia, período em que ocorreu a maior taxa germinativa em todos os meios testados (Figura 8). Esses resultados corroboram Luis (2016), que obteve as maiores taxas de germinação em *P. peruviana* (96,96%) no sétimo dia após a semeadura *in vitro*.

No décimo quarto dia da semeadura, 100% das sementes dos meios MS  $\frac{1}{2}$  e MS  $\frac{3}{4}$  já haviam germinado, enquanto no meio MS ao final desse período a germinação se deu em 87% das sementes, totalizando 100% das sementes germinadas aos dezessete dias de cultivo; o que demonstra a alta capacidade da *P. peruviana* para germinar *in vitro*, e o elevado potencial para produção de mudas, independente do meio testado. Médias inferiores as obtidas neste estudo foram relatadas por Luis (2016) ao testar a germinação *in vitro* de *P. philadelphica* (69,3%) em meio MS, que ocorreu entre o sétimo e o décimo dia da semeadura.

Considerando que as sementes de *P. peruviana* apresentaram comportamento e picos de germinação semelhantes para os meios MS  $\frac{3}{4}$  e MS  $\frac{1}{2}$ , adotou-se nesse trabalho o meio MS  $\frac{1}{2}$  por amortizar os custos com a aquisição de macro e micronutrientes.

A utilização do meio de cultivo MS em composições mais diluídas também foi relatada para a etapa de multiplicação da espécie *P. peruviana*: Chaves et al. (2005) usou o meio MS  $\frac{3}{4}$  e Rodrigues et al. (2013) identificou o meio MS  $\frac{1}{2}$  como o mais adequado para a multiplicação da espécie, após avaliar as concentrações de sais do meio MS (1,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{3}$ ).

O uso de meios com menores concentrações salinas é indicado por Oliveira et al. (2013) para o estabelecimento *in vitro* de *P. angulata*. Os autores avaliaram os efeitos dos meios de cultura WPM, MS e MS  $\frac{1}{2}$  e constataram que os meios WPM e MS  $\frac{1}{2}$  foram os mais propícios para o desenvolvimento inicial das plântulas.

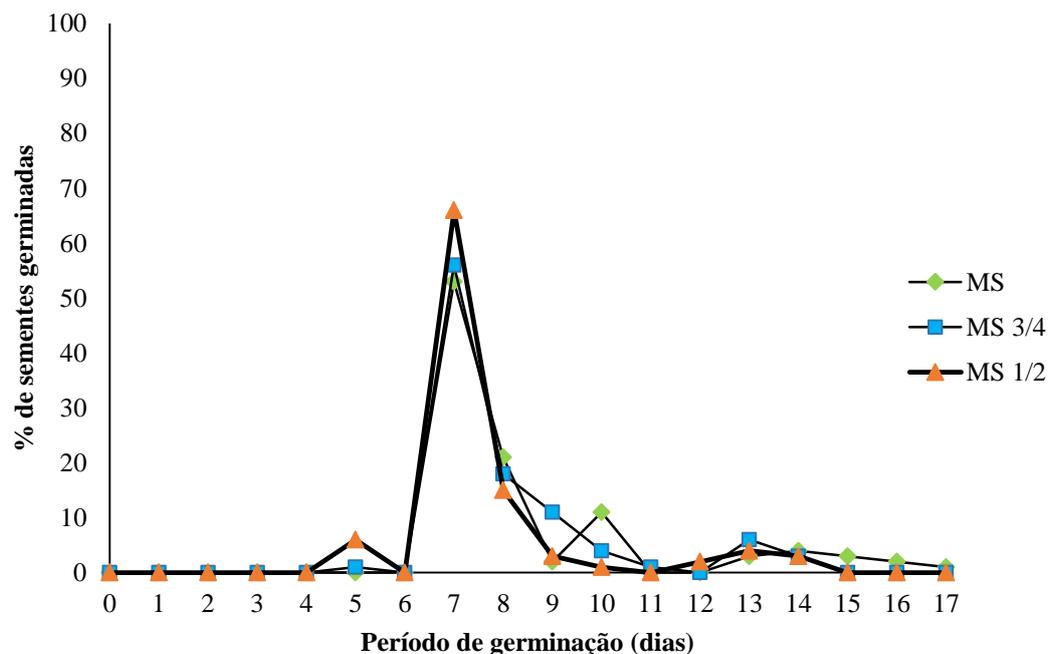


Figura 8. Frequência da germinação de sementes de *Physalis peruviana* L. em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sais. UEFS, Feira de Santana-BA, 2017.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a importância do estabelecimento do meio de cultura para germinação de uma espécie vegetal *in vitro*. De acordo com Caldas et al. (1998), os meios nutritivos usados para cultivar células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias fundamentais para o crescimento dos tecidos e controlam boa parte do desenvolvimento *in vitro*. Dessa forma, é importante conhecer sobre o hábito e características peculiares da planta, de forma que se possa compor a formulação mineral mais adequada para a espécie a qual se deseja cultivar *in vitro*, considerando um menor custo.

## 4.2 Multiplicação

Neste trabalho, a utilização de diferentes explantes, bem como a excisão em suas extremidades basal e apical foi essencial na avaliação do tecido vegetal e localização da área com maior potencial para provocar uma resposta morfogênica *in vitro*. De acordo com George (2008), a escolha do explante influenciará o tipo de resposta que se deseja obter, resultando em sucesso ou fracasso de todo o processo de micropropagação.

Os explantes folha e cotilédone apresentaram resposta morfogênica apenas na base do explante, enquanto para os explantes nó cotiledonar, epicótilo e hipocótilo essa resposta ocorreu em ambas as extremidades do tecido, embora sem uniformidade para todas as amostras. A excisão nas duas extremidades é importante para estimular a divisão celular no local fragmentado e aumentar a área de superfície em contato com o meio, o que favorece maior absorção dos nutrientes pelos tecidos (KERBAUY, 2008).

A análise de variância demonstrou que a interação EXP x BAP foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis porcentagem de explantes com calos (%EC), área do explante coberta com calo (AEC), número de brotos por organogênese direta (NB/OD) e porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos por organogênese direta (%ERB/OD) (Tabela 2). Para porcentagem de calos com brotos (%CB) e número de brotos por organogênese indireta (NB/OI) houve apenas efeito isolado significativo do explante ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes com calos (%EC), área do explante coberta com calos (AEC), porcentagem de calos com brotos (%CB), número de brotos por organogênese indireta (NB/OI), número de brotos por organogênese direta (NB/OD), porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos por organogênese direta (%ERB/OD) em diferentes explantes de *Physalis peruviana* L. em meio de cultura MS ½ suplementados com diferentes concentrações de BAP aos 30 dias do cultivo *in vitro*. Feira de Santana - BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios					
		%EC <sup>X</sup>	AEC <sup>Y</sup>	%CB <sup>X</sup>	NB /OI <sup>Y</sup>	NB/OD <sup>Y</sup>	%ERB/OD <sup>X</sup>
<b>EXP</b>	5	5.456349**	73402274**	0.020626**	0.258158**	27218827**	514583333**
<b>BAP</b>	4	0.693584**	2694522 <sup>ns</sup>	0.000891 <sup>ns</sup>	0.030917 <sup>ns</sup>	1426137**	3815666667**
<b>EXP*BAP</b>	20	0.337207**	6728070**	0.002265 <sup>ns</sup>	0.023841 <sup>ns</sup>	1129002**	217083333**
<b>ERRO</b>	120	0.071153	1.304.937	0.001866	0.024367	0.043836	93.750.000
CV%		29.25	27.15	4.26	14.90	14.00	46.85

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>X</sup>Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$ . <sup>Y</sup>Dados transformados pela função  $(x+1)^{0,5}$ .

Em meio de cultura isento de regulador vegetal não houve diferenças significativas entre os explantes folha, nó cotiledonar, epicótilo e hipocótilo, porém estes diferiram em relação ao

cotilédone e raiz, os quais apresentaram as menores médias para porcentagem de explantes com calos (%EC) (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de explantes com calos (%EC) e área do explante coberta com calo (AEC) em diferentes explantes de *Physalis peruviana* L. em meio de cultura MS ½ suplementados com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana - BA, 2017.

BAP (µM)	EXPLANTES					
	%EC					
	Cotilédone	Folha	Nó cotiledonar	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz
0,00	10,0 b	55,0 a	75,0 a	75,0 a	55,0 a	0,00 b
2,22	95,0 a	85,0 a	100,0 a	80,0 a	85,0 a	0,00 b
4,44	45,0 c	90,0 ab	95,0 a	85,0 ab	60,0 bc	0,00 d
6,66	75,0 ab	90,0 a	85,0 a	45,0 bc	60,0 ab	15,0 c
8,88	55,0 b	95,0 a	95,0 a	25,0 bc	55,0 b	0,00 c
CV%	29,25					
BAP (µM)	AEC					
	Cotilédone	Folha	Nó cotiledonar	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz
	0,00	2,50 b	18,75 a	35,00 a	30,00 a	32,50 a
2,22	23,75 a	32,50 a	37,50 a	25,00 a	26,50 a	0,00 b
4,44	11,25 b	66,25 a	27,50 b	32,50 b	21,25 b	0,00 c
6,66	16,25 ab	32,50 a	27,50 a	17,50 ab	20,00 a	8,75 c
8,88	13,75 bc	28,75 ab	41,25 a	8,75 cd	20,00 abc	0,00 d
CV%	27,15					

\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A formação dos calos representa uma resposta do tecido às injúrias, à indução química ou ao efeito do regulador vegetal, em suas diferentes concentrações, sobre o genótipo (SILVA et al., 2003). Assim, a calogênese na ausência de reguladores vegetais, sugere que há um balanço entre a auxina e a citocinina endógenas nos tecidos testados. De acordo com Nogueira et al. (2007), o balanço entre níveis endógenos desses hormônios podem induzir a proliferação celular e contribuir para que células somáticas diferenciadas e especializadas tornem-se desdiferenciadas.

Na concentração de 2,22 µM de BAP apenas a raiz não apresentou potencial para a calogênese, tendo os outros explantes não diferido estatisticamente entre si para esta variável. Na concentração de 4,44 µM de BAP, o explante nó cotiledonar apresentou taxas superiores a cotilédone, hipocótilo e raiz para formação de calos, entretanto não diferiu de folha e epicótilo. Em 6,66 µM de BAP, os explantes folha e nó cotiledonar foram significativamente superiores a epicótilo e raiz, sem diferir dos explantes cotilédone e hipocótilo. Já na concentração de 8,88 µM de BAP, a folha e o nó cotiledonar foram significativamente superior aos demais explantes utilizados, com 95% de calogênese para ambos os tecidos (Tabela 4).

Neste trabalho, observou-se um potencial diferencial dos tecidos na formação de calos, o que confirma a importância de testes com diferentes explantes de uma mesma planta.

Elevadas taxas de formação de calos foram obtidas nos explantes folha e nó cotiledonar em todos os tratamentos testados (Tabela 4).

Com relação a AEC, a raiz mostrou-se inferior aos demais explantes em todas as concentrações testadas, exceto em meio de cultura isento de BAP e suplementado com 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, nos quais não diferiu estatisticamente dos explantes cotilédone e epicótilo, respectivamente. A calogênese nesse explante só ocorreu na concentração 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, com uma área do explante coberta com calos de apenas 8,75% (Tabela 4), o que sugere a alta especialização celular em raízes de *P. peruviana*.

Esses resultados corroboram os encontrados por Bertoncelli e Oliveira (2010), que ao trabalharem com *P. pubescens* obtiveram regeneração do sistema radicular com baixa produção de calos. A ausência de resposta morfogênica nos tecidos da raiz foi demonstrada por Lima-Brito (2011) e Vidal (2008) em testes com diferentes concentrações de BAP, nas espécies *Comanthera mucugensis* subsp. *mucugensis* e *P. angulata*, respectivamente. De acordo com Lemos (2010), algumas células, mesmo quando estimuladas por reguladores vegetais nunca se tornam morfogênicas, pois perderam sua capacidade de se rediferenciar e formar tecidos.

Os explantes folha, nó cotiledonar, epicótilo e hipocótilo não diferiram estatisticamente entre si para a área de cobertura do explante com calos, mas foram significativamente superiores as médias do cotilédone, em meio isento de regulador. Em 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, apenas o explante raiz divergiu estatisticamente em relação aos demais explantes. Na concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, o explante foliar apresentou a maior expansão da área coberta com calos (62,25%), já na concentração de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP a folha não diferiu do nó cotiledonar e do hipocótilo (Tabela 4).

A análise de regressão para os tratamentos com BAP foi significativa apenas para o explante folha, evidenciando um modelo matemático quadrático ascendente para o percentual de explantes com calos, sendo o valor máximo estimado (95,56%) obtido na concentração de 6,84  $\mu\text{M}$  de BAP (Figura 9).

Não há informações disponíveis na literatura acerca do uso de BAP para indução de calos organogênicos em *Physalis*. Nesse trabalho, os resultados demonstram que baixas concentrações dessa citocinina são suficientes para induzir altas médias para %EC na espécie em estudo, corroborando Bertoncelli e Oliveira (2010) que demonstraram que explantes de pecíolo e caule de *P. pubescens* quando submetidos a concentrações de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP isolado ou em associação com de 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA originam calos com potencial embriogênico.

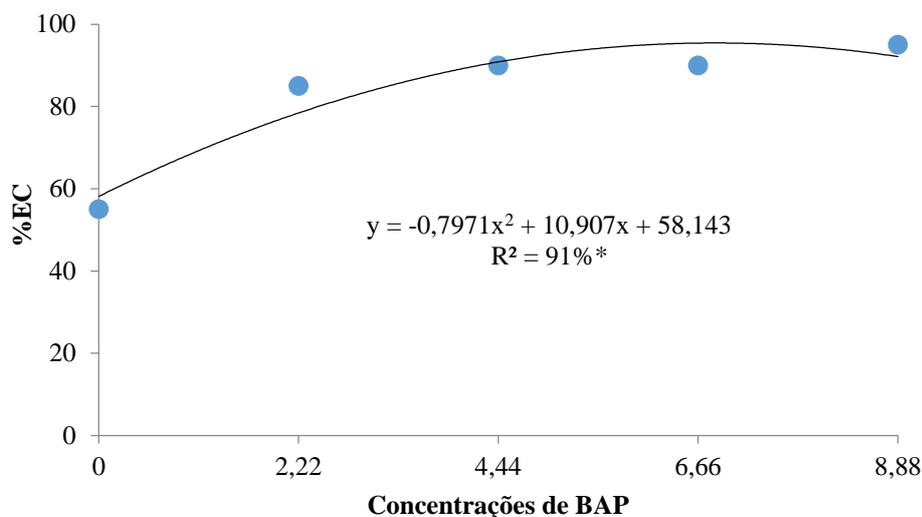


Figura 9. Porcentagem de explantes com calos (%EC) em explantes foliares de *Physalis peruviana* L. cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. UEFS, Feira de Santana – BA, 2017.

Estudos com outras herbáceas, como a *Cissus verticillata* L. Nicolson & C. E. Jarvis, realizado por Rocha et al. (2013), indicaram que as maiores porcentagens de cobertura do explante foram observadas nos tratamentos com 5,77  $\mu\text{M}$  e 17,76  $\mu\text{M}$  de BAP, em que todos os explantes apresentaram 100% da área foliar coberta com calo. Já Rodrigues e Almeida (2010), conseguiram 100% da área foliar coberta com calos para a *Cissus sicyoides* L., utilizando a dosagem de 26,64  $\mu\text{M}$  de BAP. As respostas diferenciais de cada espécie em resposta a diferentes concentrações de BAP justifica o estabelecimento de protocolos específicos.

A formação de calos em *P. peruviana* é uma característica relevante para a obtenção de metabólitos secundários de importância econômica, os quais têm sido utilizados na indústria farmacêutica e de produtos alimentícios. Além disso, a calogênese é importante quando se visa o melhoramento genético devido ao potencial de variabilidade genética associado à formação de calos (NIKAN; SHITOLE, 1999).

Os calos oriundos das folhas apresentaram coloração variando entre branco, bege claro, bege escuro e translúcido (Figura 10). De modo geral, os calos eram friáveis, independente da coloração e sua formação ocorreu na superfície adaxial para todas as concentrações testadas, exceto quando em 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, na qual os calos formaram-se também na parte abaxial (Figura 10). De acordo com George (2008), características do calo, tais como a textura e morfologia, variam conforme os constituintes do meio nutritivo e as dosagens de reguladores, o que pode resultar em calos compactos ou friáveis.

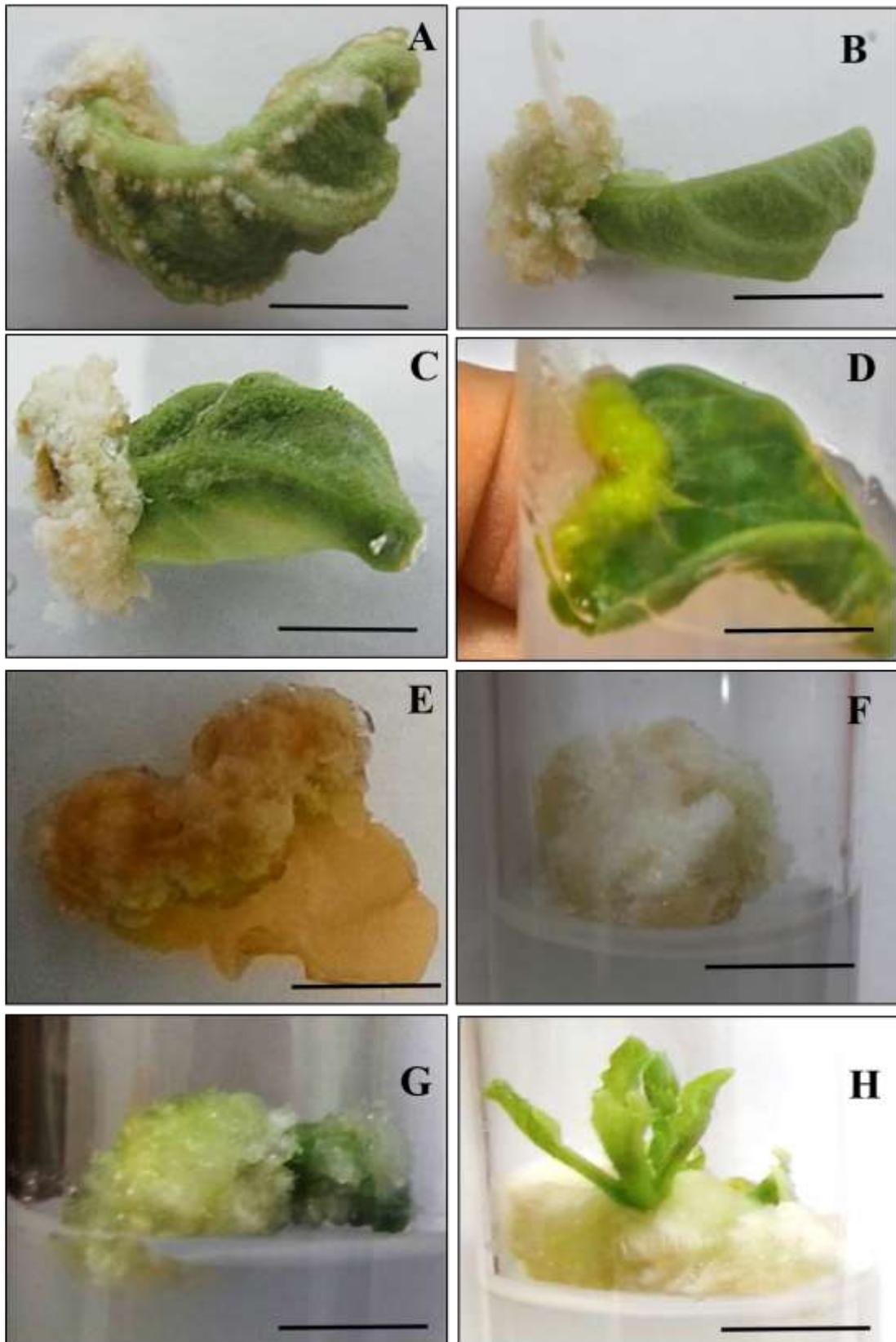


Figura 10. Calogênese em explantes foliares cultivados em meio  $MS\frac{1}{2}$  sob diferentes concentrações de BAP. Calos na região abaxial com coloração bege (A). Calos na região adaxial: coloração bege (A, B, C, F), coloração verde (E), coloração branco e translúcida em algumas regiões (G), coloração branca (H). Barra: 1 cm. Fonte: Autora (2017).

A presença do pigmento antocianinas foi identificada em folhas (Figura 11-G) e calos das plantas oriundas desse experimento, esse pigmento geralmente ocorre em culturas cujas espécies já produzem naturalmente. Embora não haja registros de trabalhos sobre a presença de antocianinas na espécie *P. peruviana*, esse metabólito já foi observado por Vidal (2008), em *P. angulata* na base da plântula e na parte aérea. Em meio livre de regulador vegetal, verificou-se uma intensa rizogênese no tecido foliar (Figura 11-H).

De modo geral, para as variáveis EC e AEC, os explantes folha e nó cotiledonar apresentaram os melhores resultados em todas as concentrações de BAP testadas, mas considerando que o explante foliar proporcionou um bom potencial para a formação de calos (95% dos explantes com calos em meio suplementado com BAP), uma área coberta com calos de 66,25% quando comparada aos outros explantes em meio de cultura suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e pela possibilidade de se obter maior número de explantes numa única planta, esse explante foi selecionado para indução da calogênese, com vistas a obtenção de brotos por organogênese indireta.

Na análise da organogênese indireta, para a variável porcentagem de calos com brotos (Figura 11 – C, D), o explante folha diferiu dos demais, apresentando 15,92% de regeneração, com uma média de 0,71 brotos por explante (Tabela 5). Para os demais explantes, a porcentagem de explantes responsivos à regeneração de brotos e o número de brotos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 5). Este resultado é vantajoso, considerando a disponibilidade de maior número de explantes foliares por planta, permitindo assim alta taxa de multiplicação a partir de uma planta matriz. Esses relatos discordam dos obtidos para a *P. pubescens* (BERTONCELLI; OLIVEIRA, 2010) e para outras plantas medicinais, como a *Cissus verticillata* L. Nicolson & C. E. Jarvis (ROCHA et al., 2013) e *Cissus sicyoides* L. (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010), nos quais os autores não obtiveram regeneração de brotos em calos oriundos das folhas.

Tabela 5. Efeito do explante sobre a porcentagem de calos com brotos (%CB) e número de brotos obtidos por organogênese indireta (NB/OI) a partir de diferentes explantes de *Physalis peruviana* L. Feira de Santana - BA, 2017.

EXPLANTE	%CB	NB /OI
Cotilédone	0,00 b	0,01 b
Folha	15,92 a	0,71 a
Nó cotiledonar	0,00 b	0,03 b
Epicótilo	0,13 b	0,01 b
Hipocótilo	0,13 b	0,02 b
Raiz	0,00 b	0,00 b
CV%	4,26	14,90

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em estudos com outras Solanaceae, Dill (2014) e Tavares (2009), regeneraram, respectivamente, brotos de *Rosmarinus officinalis* e *Cyphomandra betacea* pela via indireta. A primeira, a partir de calos caulinares provenientes de meio sem reguladores transferidos para meio MS acrescido de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (65%), a segunda, a partir de calos oriundos dos segmentos nodais em meio com 2,00  $\mu\text{M}$  de BAP (56,36%).

Para a variável número de brotos por explante via organogênese direta, o explante nó cotiledonar apresentou capacidade acentuada para regenerar brotos por organogênese direta em todas as concentrações testadas quando comparado aos demais explantes (Tabela 6). Esses resultados demonstram a eficiência desse explante na multiplicação celular da *P. peruviana*. A regeneração dos brotos por essa via de regeneração é importante, pois além de dar-se brevemente e com um menor custo, proporciona menor risco de variação genética (GEORGE, 2008), o que é essencial para a produção de mudas em escala comercial.

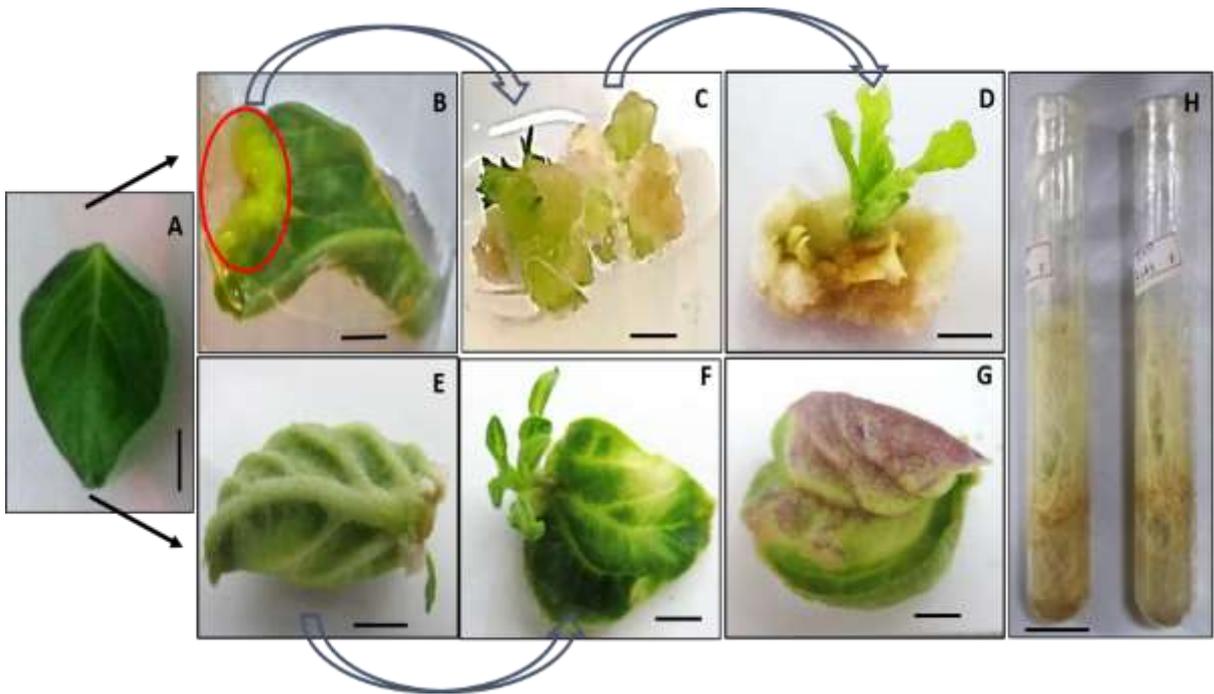


Figura 11. Morfogênese *in vitro* de *Physalis peruviana* L. quando suplementado em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  suplementado com BAP a partir do explante folha. Explante foliar (A). Calogênese em meio com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP (B). Organogênese indireta em meio suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP (C, D). Organogênese direta em meio com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP (E, F). Pigmento antocianina em folha cultivada *in vitro* (G). Intensa rizogênese em meio isento de regulador vegetal (H). Barra: 1 cm. Fonte: Autora (2017).

Tabela 6. Média do número de brotos por explante obtido por organogênese direta (NBE/OD) e porcentagem de brotos por organogênese direta (% Brotos/OD) em *Physalis peruviana* L. aos 30 dias de cultivo em meio de cultura MS ½ suplementados com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana - BA, 2017.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	EXPLANTES					
	NBE/OD					
	Cotilédone	Folha	Nó cotiledonar	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz
0,00	0,00 b	0,00 b	2,284 a	0,05 b	0,00 b	0,00 b
2,22	0,00 b	0,35 b	11,05 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b
4,44	0,10 c	0,50 c	13,65 a	1,85 b	0,05 c	0,00 c
6,66	0,05 b	0,75 b	15,75 a	0,85 b	0,00 b	0,00 b
8,88	0,00 b	0,00 b	23,55 a	0,00 b	0,15 b	0,00 b
CV%	14,00					
	% Brotos (OD)					
0,00	0,00 b	0,00 b	100,00 a	5,00 b	0,00 b	0,00 b
2,22	0,00 b	10,00 b	100,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b
4,44	5,00 d	20,00 bc	100,00 a	35,00 b	5,00 cd	0,00 d
6,66	5,00 b	15,00 b	100,00 a	10,00 b	0,00 b	0,00 b
8,88	0,00 b	0,00 b	100,00 a	0,00 b	10,00 b	0,00 b
CV%	46,85					

\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise de regressão foi significativa para o explante nó cotiledonar, cujo modelo linear crescente foi o mais representativo para essa variável, evidenciando que o suprimento exógeno de BAP ao meio de cultura potencializou a multiplicação, promovendo o aumento no número de brotos, o qual atingiu na concentração 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP uma média de 23,55 brotos por explante (Figura 12).

Similarmente, trabalhando com o explante nó cotiledonar, os autores Jahirhussain et al. (2016) utilizando meio MS ½ e Sheeba et al. (2010) usando meio MS e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, obtiveram, para a *P. minima*, média de 13,4 brotos por explante e  $19,0 \pm 8,59$  brotos por explante, respectivamente. Já Afroz et al. (2009), em experimentos com a *P. minima* e Ramasubbu (2009), trabalhando com a espécie *P. angulata* obtiveram os melhores resultados de brotações em nó cotiledonar em concentrações de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e meio MS.

Utilizando o nó cotiledonar são relatados na literatura resultados que divergem dos obtidos neste estudo em relação à concentração de BAP para obtenção de brotos via organogênese direta: Chaves et al. (2005) e Rodrigues et al. (2013) verificaram em *P. peruviana* o maior número de brotações (1,75 brotos por explante) e (3,0 brotos por explante) em concentrações de 1,33  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,77  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente. Oliveira et al. (2013), conseguiram a maior taxa de brotos (2,84 brotos por explante) para a *P. angulata*, utilizando a concentração 1,33  $\mu\text{M}$  de BAP. Sabe-se que a competência morfogênica é um processo complexo e tais diferenças indicam que a concentração dos reguladores, o local de excisão, o tipo de tecido, bem como o genótipo podem determinar a taxa de multiplicação e a via de

regeneração dos brotos, comprovando as afirmações de Costa et al. (2015), ao relatar que dentro de um mesmo gênero e até de uma mesma espécie, os genótipos podem responder distintamente aos processos morfogênicos *in vitro*.

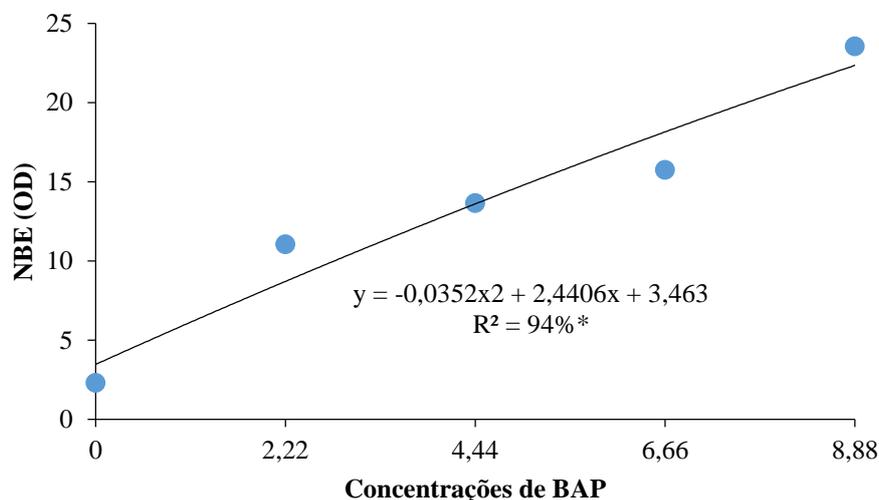


Figura 12. Média do número de obtido por organogênese direta (NBE/OD) em nó cotiledonar de *Physalis peruviana* L. aos 30 dias de cultivo em meio de cultura MS ½ suplementados com diferentes concentrações de BAP. UEFS, Feira de Santana – BA, 2017. brotos por explante

Um fator que deve ser levado em consideração na micropropagação é o tamanho dos brotos, uma vez que quando muito reduzido dificulta sua individualização na repicagem e requer uma fase posterior de alongamento antes ou durante o processo de enraizamento. Os testes de multiplicação para a *P. peruviana*, mostrou que embora o aumento na concentração do BAP tenha promovido maior número de brotações, os brotos, em geral, eram pequenos ou pouco alongados (1 cm). Em contrapartida, quando submetido a meio sem regulador vegetal observou-se queda no número de brotos, seguido de maior crescimento dos mesmos (4 cm), o que pode estar relacionado ao efeito da citocinina na quebra da dominância apical, indução de novos brotos e promoção de brotações mais curtas.

Efeitos similares aos encontrados nesse trabalho foram relatados por Chaves et al. (2005) e Rodrigues et al. (2013), ao observarem efeitos de BAP em brotos de *P. peruviana*, os quais verificaram maior comprimento dos brotos na ausência da citocinina e menor comprimento das brotações quando suplementaram o meio MS ½ com 1,33 µM de BAP e 5,77 µM de BAP, respectivamente. Vidal (2008) também obteve maior comprimento dos brotos em *P. angulata* cultivadas em meio isento de BAP e menor comprimento em meio de cultura suplementado por BAP isolado ou em associação com outros reguladores de crescimento.

Flores et al. (2009) também verificaram que o comprimento dos brotos em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) foram inversamente proporcionais às concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo, sendo os maiores comprimentos registrados na ausência do regulador.

Os resultados verificados nesse trabalho ratificam as afirmações de Gratapaglia; Machado (1998) de que o aumento nas concentrações de BAP surtem efeito positivo na produção de partes aéreas até determinada concentração, e que a partir desta pode haver inibição no alongamento dos tecidos. Esta resposta pode ter sido influenciada pela ação da citocinina no aumento de divisões celulares, porém produzindo células de menor tamanho (TAIZ; ZEIGER, 2009), o que conseqüentemente reduziu o tamanho dos brotos.

Estatisticamente o explante nó cotiledonar foi significativamente superior aos explantes cotilédone, folha, epicótilo, hipocótilo e raiz em todas as concentrações testadas, cuja taxa máxima de explantes responsivos foi 100%, enquanto os demais explantes não diferiram entre si, exceto para a concentração 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP (Tabela 6).

Os resultados encontrados nesse trabalho, discordam daqueles obtidos por Silva et al. (2006), com a espécie *Cucurbita pepo* L., no qual observaram aumento da percentagem de explantes cotiledonares com brotações adventícias, atingindo um máximo de 70% na concentração de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP adicionado ao meio de cultivo.

Além dos fatores discorridos acima, aspectos qualitativos devem ser analisados, pois é fundamental que ao obter altas taxas de regeneração nas brotações, a boa qualidade e tamanho das partes aéreas acompanhem esse fator, pois isso determinará o sucesso das etapas posteriores da micropropagação.

Ao avaliar o aumento da taxa proliferativa para o explante nó cotiledonar via organogênese direta, o modelo de regressão apresentou comportamento quadrático ascendente ( $p < 0,05$ ), com o qual estima-se atingir o número máximo (19,56 brotos por explante) na concentração de 12,50  $\mu\text{M}$  de BAP. Observa-se que a partir desse ponto, concentrações superiores de BAP promovem um decréscimo considerável na formação de brotos de *P. peruviana* (Figura 13).

Em relação ao aspecto dos brotos, os resultados obtidos nesse experimento foram similares aos obtidos no experimento anterior, nos quais meio isento de regulador promoveu menor taxa proliferativa, porém os brotos eram mais alongados.

Nesse experimento, a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos por organogênese direta foi de 100% para todas as concentrações de BAP testadas.

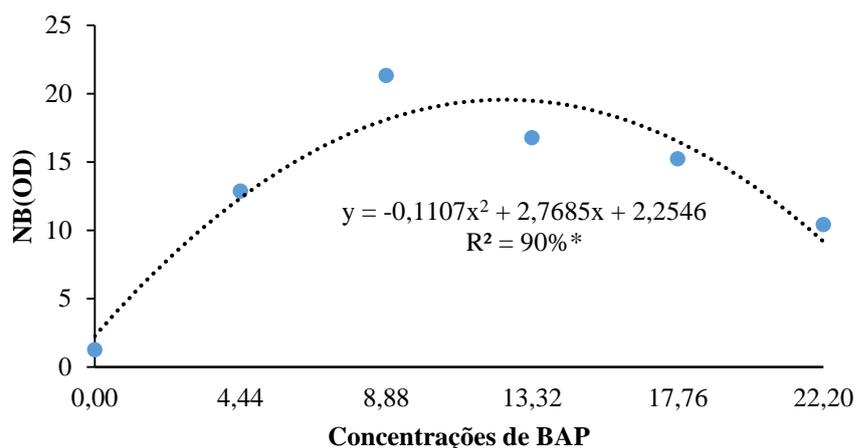


Figura 13. Média do número de brotos por explante (NBE) obtido por organogênese direta em nó cotiledonar de *Physalis peruviana* L. aos 30 dias de cultivo em meio de cultura MS ½ suplementados com diferentes concentrações de BAP. UEFS, Feira de Santana – BA, 2017.

### 4.3 Enraizamento *in vitro*

A etapa de enraizamento foi necessária para *P. peruviana* visto que um número reduzido de brotos apresentou raízes e essas foram pequenas, em pequeno número e frágeis. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de enraizamento entre os tratamentos com carvão ativado e sem carvão ativado. Aos 30 dias, 100% das plantas cultivadas nos dois tratamentos enraizaram e de modo geral, as raízes foram finas, longas e ramificadas.

As raízes finas constituem um recurso essencial para as plantas acessarem os nutrientes do solo, sendo seu comprimento e ramificações indicadores da capacidade de absorção, assim, quanto maior o enraizamento maior a capacidade de explorar o solo e aproveitar os nutrientes e a água disponíveis, o que garante maior taxa de sobrevivência e melhor desenvolvimento das plantas *ex vitro* (FREITAS et al., 2008; SAINI et al., 2013).

Não há relatos específicos para enraizamento em *P. peruviana in vitro* com carvão ativo. Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram os obtidos por Contreras e Almeida (2003) e Vidal (2008), para a *P. ixocarpa* e *P. angulata*, respectivamente, as quais enraizaram sem suplementação de auxina, o que sugere que essas espécies dispõem de altas concentrações de auxina endógena, fator importante para a redução dos custos, já que não há necessidade do uso de carvão e nem de reguladores vegetais para induzir as raízes.

### 4.4 Aclimatização

Durante a etapa de aclimatização observou-se altas taxas de sobrevivência das plantas em todos os tratamentos testados, com uma porcentagem de sobrevivência de 100% aos 90 dias da transferência, o que demonstra que essa espécie possui alta capacidade de resistência quando submetidas a transição entre as condições *in vitro* e *ex vitro*, sugerindo que a aclimatização não se constitui num fator limitante à micropropagação da *P. peruviana*.

Altas taxas de sobrevivência foram relatadas para as espécies *P. peruviana*, *P. alkekengi* e *P. angulata*, por Luis (2016), Muniz (2013) e Pereira (2011), os quais obtiveram 100% de sobrevivência das plantas aclimatizadas, usando, respectivamente, substratos: (terra, turfa e areia), Tecnomax® e terra vegetal. Afroz et al. (2009) e Intzaar et al. (2013), alcançaram taxas próximas (90% de sobrevivência) às obtidas por esses autores e às alcançadas nesse trabalho, para *P. minima* após transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* em substratos: (solo, areia e composto) e (turfa e areia), respectivamente.

Resultados inferiores aos obtidos neste trabalho foram relatados na aclimatização de *P. peruviana* e *P. angulata*. Para a primeira espécie foi verificado 68,75% utilizando como substrato comercial Tecnomax® (MUNIZ, 2013), e para a segunda, taxas de sobrevivência de 50%, utilizando a fibra do coco e solo (RAMASUBBU, 2009).

Embora não tenham sido estimados os dados quantitativos referentes ao desenvolvimento das plantas aclimatizadas, todas as amostras tiveram comprimento médio de 19 cm aos 30 dias da transferência, sendo notável o crescimento das mudas ao final do experimento.

#### **4.5 Análise histológica**

As análises histológicas durante a etapa de multiplicação permitiram confirmar que a regeneração dos brotos em *P. peruviana* ocorreu por duas vias organogênicas: direta, pela formação de brotos no explante nó cotiledonar, em meio de cultura contendo 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP; e indireta a partir do explante folha em meio suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP (Figura 14).

Estudos morfológicos e anatômicos permitem elucidar o processo de organogênese *in vitro*, sendo os cortes histológicos essenciais para confirmação das vias de regeneração dos brotos, excluindo a probabilidade de interpretações equivocadas sobre a origem dos brotos formados a partir das gemas provenientes dos explantes (ALVES et al., 2004).

Em corte transversal do nó cotiledonar observou-se formação de zona meristemática a partir de células diferenciadas maduras na região do córtex, na qual a diferenciação dos

primórdios foliares culminou na diferenciação dos brotos, cuja conexão vascular com os tecidos do explante caracterizou o processo de regeneração por organogênese direta (Figura 14 B, C).

O corte longitudinal dos calos induzidos no explante folha revelou a formação de estruturas esféricas contendo centros morfogênicos organizados, com células pequenas, indiferenciadas, algumas mais alongadas que outras (Figura 14 E). De acordo com Nepomuceno (2012) as células mais alongadas, como as visualizadas nesse trabalho, no tecido do calo podem sinalizar o início da diferenciação celular. Na Figura 14 D, pode ser observado pontuações verdes correspondentes a formação de gemas (Figura 14 E), as quais se diferenciaram formando meristemóides (Figura 14 F) e o início da formação de brotos adventícios (Figura 14 F), comprovando a organogênese indireta. Embora a multiplicação de células indiferenciadas de forma desordenada caracterize os calos, alguns tipos celulares presentes nesse tecido podem voltar a se diferenciar e apresentar-se associadas aos centros de morfogênese, constituindo órgãos, como os brotos (GEORGE, 2008).

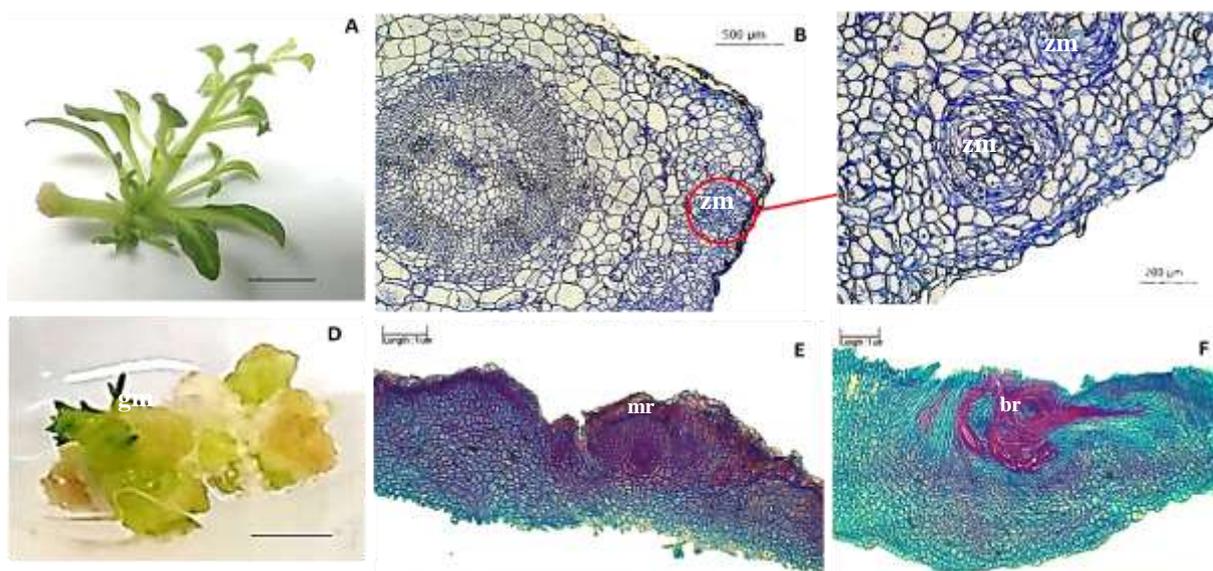


Figura 14. Organogênese direta de *Physalis peruviana* L. a partir do explante nó cotiledonar cultivado em 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP e organogênese indireta de segmentos foliares em 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP. Vista geral dos brotos provenientes de nó cotiledonar (A). Secção transversal do nó cotiledonar (B). Ampliação dos centros meristemáticos (C). Vista geral (D) e secção longitudinal dos calos com meristemóides (E). Iniciação de brotos (F). Barra: 1cm (A, D). zm = zona mesistemática; gm = gemas; mr = mesistemóides. br = brotos adventícios. UEFS, Feira de Santana - BA, 2018.

## 4.6 Análises bioquímicas

### 4.6.1 Análise de proteínas solúveis, açúcares redutores e açúcares solúveis totais

A análise bioquímica dos extratos de *P. peruviana* revelou que a concentração de metabólitos primários não diferiu entre os ambientes de cultivo, nos três tipos de tecidos avaliados, exceto para o teor de açúcares solúveis totais em que o cultivo *ex vitro* proporcionou maior concentração desse metabólito em tecidos foliares (Figura 15).

Os extratos foliares de plantas cultivadas *ex vitro* e *in vitro* apresentaram maior teor de proteínas do que os extratos de caule e raiz cultivados sob as mesmas condições (Figura 15 A). Esses resultados sugerem maior utilização de aminoácidos livres para a síntese de proteínas no tecido foliar, enquanto no tecido caulinar e radicular o menor teor pode estar associado a maior atividade catabólica de proteínas. De acordo com Muller (2008) o aumento no teor de proteínas em um tecido indica alterações no metabolismo celular, os quais determinam a necessidade de proteínas específicas para garantir que suas funções sejam executadas.

Comportamento similar foi observado para o teor de açúcares redutores (AR). Os extratos de folhas apresentaram maiores teores quando comparado aos extratos de caules e raízes sob as mesmas condições de cultivo (Figura 15 B). Verifica-se que há uma relação inversa entre o teor de AR e a síntese de proteínas nas plantas de *P. peruviana* nos diferentes tecidos analisados: o teor de AR menor em relação ao teor de proteínas nos mesmos tecidos pode ser justificado uma vez que a energia necessária para a síntese de proteínas é liberada pelo catabolismo dos carboidratos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quanto ao teor de AST, a folha foi significativamente superior apenas ao explante raiz, nos dois ambientes de cultivo. O teor de AST diferiu em folhas de plantas de *P. peruviana* cultivadas *ex vitro* e *in vitro*, sendo maior em plantas cultivadas *ex vitro*, enquanto para os explantes de caule e raiz o teor desse metabólito não diferiu entre os ambientes avaliados (Figura 15 C). O maior teor de açúcares solúveis em folhas cultivadas *ex vitro* reflete o estado metabólico da fotossíntese e a capacidade de translocação destes para os tecidos de reserva, ao mesmo tempo em que sugere que as folhas atuam como fonte de fotoassimilados. Em casa de vegetação, as plantas absorvem maior quantidade de luz resultando na maior produção de fotoassimilados e maior teor de açúcares solúveis totais, principalmente nas folhas (CARVALHO et al., 2006), enquanto a redução dos teores de AST em *P. peruviana* cultivadas *in vitro* possivelmente ocorreu em virtude das baixas taxas fotossintéticas proporcionadas por lâmpadas brancas fluorescentes, com consequente menor síntese de açúcares.

Não há relatos na literatura acerca das características bioquímicas de folha, caule e raiz para espécies do gênero *Physalis*, o que ressalta a importância de estudos de caracterização para que o potencial biológico e medicinal desses órgãos possa ser explorado.

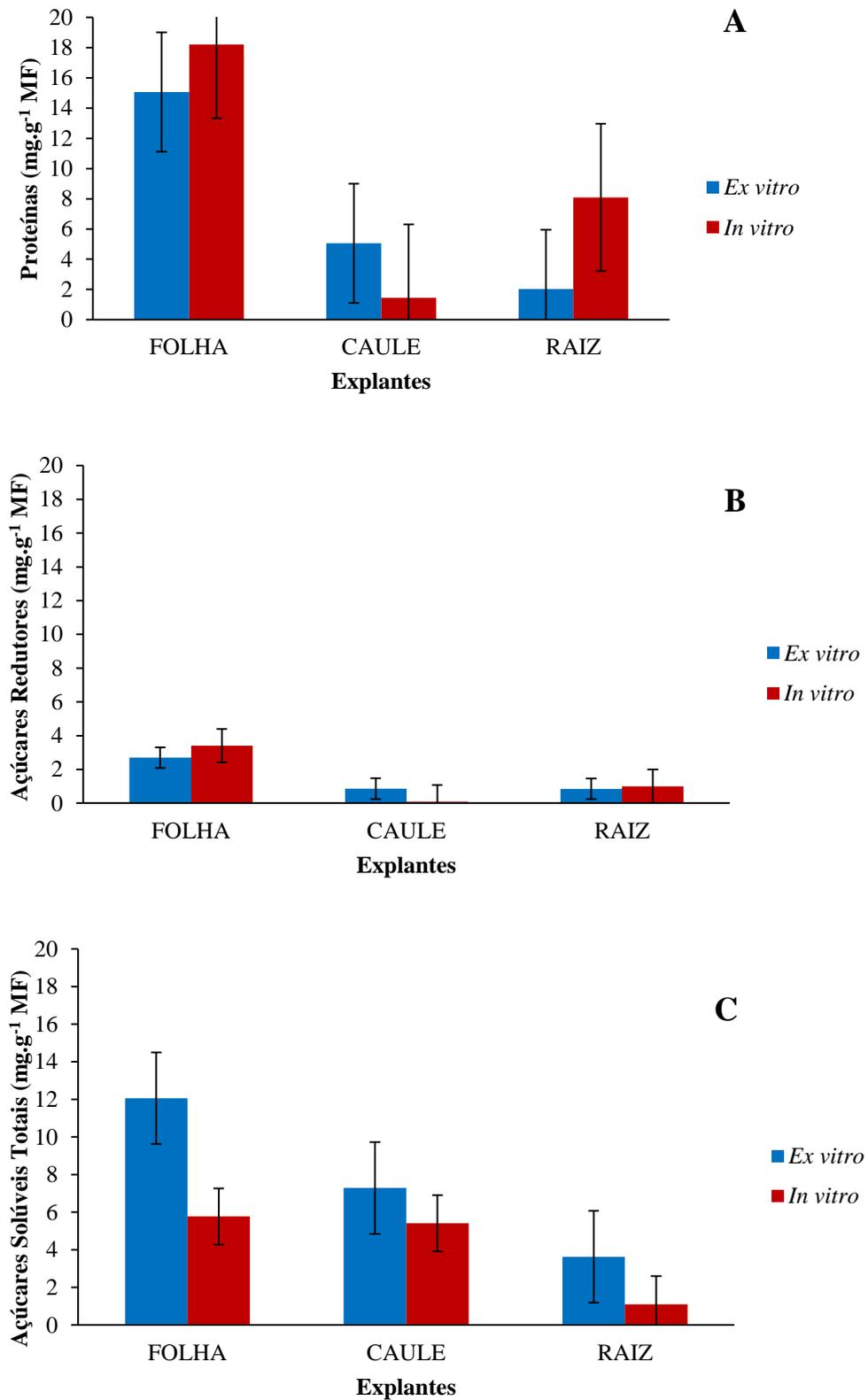


Figura 15. Teores de proteínas solúveis totais (A), Açúcares redutores (B) e Açúcares solúveis totais (C) em explantes de folha, caule e raiz de *Physalis peruviana* L. obtidos de plantas aos 45 dias de germinação das sementes em ambiente *ex vitro* e em ambiente *in vitro*. Feira de Santana, 2018.

#### 4.6.2 Teor de clorofila

Várias técnicas para extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos foram testadas por Tanan et al. (2017), entretanto, a maceração de tecidos vegetais em 80% de acetona seguida da filtração revelou-se o mais eficiente para a espécie *P. angulata*, e nesse trabalho mostrou-se eficaz para a *P. peruviana*.

Diversos trabalhos têm mostrado que os teores de pigmentos são influenciados pelas variações ambientais e experimentais (DIN et al., 2011; PEI et al., 2010; TERZI et al., 2010). Neste trabalho, as concentrações de clorofila apresentaram variações entre os ambientes de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação. Os teores de clorofila nas folhas são utilizados para estimar a capacidade fotossintética das plantas, pela sua ligação direta com a assimilação e transferência de energia luminosa ao crescimento e à adaptação a diversos ambientes (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários fatores têm sido apontados como responsáveis por limitar a atividade fotossintética de plantas *in vitro*, dentre os quais, a reduzida intensidade luminosa, a baixa concentração de CO<sub>2</sub> no recipiente de cultivo e a sacarose adicionada ao meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (DECCETTI et al., 2008).

Nesse trabalho, o maior teor de clorofila *a* foi observado em plantas cultivadas em casa de vegetação, diferindo do ambiente *in vitro* (Tabela 7). Assim a redução do teor de clorofila *a* em *P. peruviana* cultivadas *in vitro* pode indicar uma menor absorção da luz por parte desta, limitando sua taxa fotossintética e se constituindo num importante indicador de produtividade dessa espécie nos ambientes testados.

Em sistemas de cultivo *in vitro*, como a taxa de fotossíntese é mínima, o principal suprimento energético da planta é a sacarose adicionada ao meio de cultura, porém de acordo com Hdidier e Desjardins (1994), essa substância limita a síntese de clorofila das plantas produzidas. Badr et al. (2011), defendem que suplementar o meio com esse carboidrato provoca alterações consideráveis na bioquímica e fisiologia das plantas cultivadas *in vitro*, dessa forma pode-se sugerir que outro fator responsável pela redução no teor de clorofila em *P. peruviana* cultivadas sob essas condições foi a presença desse carboidrato.

Alguns autores evidenciaram que plantas submetidas a concentrações de sacarose entre 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> apresentaram quantidades significativas de açúcares solúveis na folha, sob a forma de grãos de amido no cloroplastídeo, o que pode inibir a síntese de rubisco e clorofila, impedir

a regeneração do substrato RuBP pela carência em fosfato inorgânico no estroma do cloroplastídeo e conseqüentemente, reduzir as taxas fotossintéticas (JACKSON, 1999; KANECHI et al., 1998).

Com relação aos teores de clorofila *b* acumulados nos tecidos das plantas de *P. peruviana*, o cultivo em casa de vegetação favoreceu a síntese do pigmento diferindo estatisticamente do cultivo *in vitro*, com concentrações médias de 16,67 e 12,46 µg/g, respectivamente (Tabela 7).

Por sua vez, conforme observado na Tabela 7, o teor bruto de clorofila *b* em plantas de *P. peruviana in vitro* foi superior ao da clorofila *a*, o que pode ser considerado como uma importante adaptação e vantagem para a planta, uma vez que a clorofila *b* absorve comprimentos de onda diferente da clorofila *a* e a transfere ao centro de reação, maximizando a captura de energia utilizada nas reações fotoquímicas da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, a maior concentração de clorofila *b* pode estar associada à resposta das plantas *in vitro* diante das limitações nas condições luminosas de modo a utilizá-la da forma mais eficiente possível (MARTINS et al., 2010), a baixa quantidade total de fluxo de fótons recebidos (DIGNART, 2006), e a uma degradação mais lenta da clorofila *b* em relação a clorofila *a* (ENGEL; POGGIANI, 1991).

Do mesmo modo, Costa et al. (2009), trabalhando com duas cultivares de morango (*Fragaria spp.*), constatou valores médios de clorofila *b* superiores aos da clorofila *a* em ambas as cultivares submetidas a ambientes com menor intensidade luminosa.

Os maiores teores de clorofila total para a espécie em estudo foram apresentados por plantas cultivadas em casa de vegetação (Tabela 7), corroborando os dados encontrados por Ramasubbu (2009) para a *P. angulata*. O teor de clorofila total é um importante indicativo da eficiência na produção de energia da planta, entretanto isso dependerá também do equilíbrio entre as frações de clorofila *a* e *b* (LUIS, 2016).

Tabela 7. Teores de clorofila *a*, *b* e total (µg/g de matéria fresca) em folhas de *Physalis peruviana* L. submetidas a cultivo *in vitro* e em casa de vegetação aos 45 dias de idade. Feira de Santana - BA, 2017.

Ambiente	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total
<i>In vitro</i>	9,77 b	12,46 b	22,24 b
Casa de vegetação	18,78 a	16,67 a	35,45 a
CV%	17,43	26,89	20,44

\* Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O genótipo da planta também pode influenciar no acúmulo de pigmentos fotossintéticos em diferentes ambientes. Borghezán et al. (2003), testando diferentes genótipos de porta enxerto de videira (*Vitis spp.*), comprovaram que dois deles apresentaram maior teor de clorofila total nos tecidos quando no ambiente *in vitro* em comparação ao material aclimatizado em casa de vegetação, ocorrendo o contrário com os demais genótipos.

Embora o teor de clorofila total e suas frações tenham diferido estatisticamente nos dois ambientes de cultivo, os teores de clorofila produzidos pela *P. peruviana* cultivadas *in vitro* evidenciou que esse parâmetro não foi limitante ao funcionamento do aparato fotossintético, o que é comprovado pela alta taxa de sobrevivência e boa aparência das plantas aclimatizadas.

## 4.7 Análise fitoquímica

### 4.7.1 Rendimento do extrato seco

Com a extração metanólica observou-se diferenças entre os tecidos cultivados *in vitro* e *ex vitro*. Os tecidos cultivados *in vitro* apresentaram altas taxas para rendimento das amostras: o caule *in vitro* apresentou rendimento de 43,22%, folha (39,31%), calos (34,61%) e raiz *in vitro* (19,82%) (Tabela 8).

Tabela 8. Rendimento (%) dos extratos de folha, caule e raiz de *Physalis peruviana* L. cultivados *in vitro* e em casa de vegetação e dos calos obtidos *in vitro* de extratos metanólicos. Feira de Santana - BA, 2018.

Ambiente	Folha	Caule	Raiz	Calos
<i>In vitro</i>	39,31	43,22	19,82	34,61
Casa de vegetação	18,93	19,00	13,12	-

### 4.7.2 Análise qualitativa por CLAE-DAD

Os cromatogramas mostram a similaridade do perfil químico dos extratos de calos em relação aos extratos de folha, caule e raiz *in vitro*, quando comparados nos primeiros 4 minutos do método (Figura 16). Contudo, o extrato dos calos destacou-se quanto a produção de metabólitos, visto que exibiu em seu cromatograma picos que não estão presentes nos extratos dos demais explantes, demonstrando que os calos constituem boa fonte de compostos fenólicos para a espécie, estando de acordo com os dados descritos na literatura. Rebouças (2009) afirma que o cultivo de calos permite o desenvolvimento de culturas de células que acumulam compostos em níveis mais elevados do que a planta da qual elas se originaram.

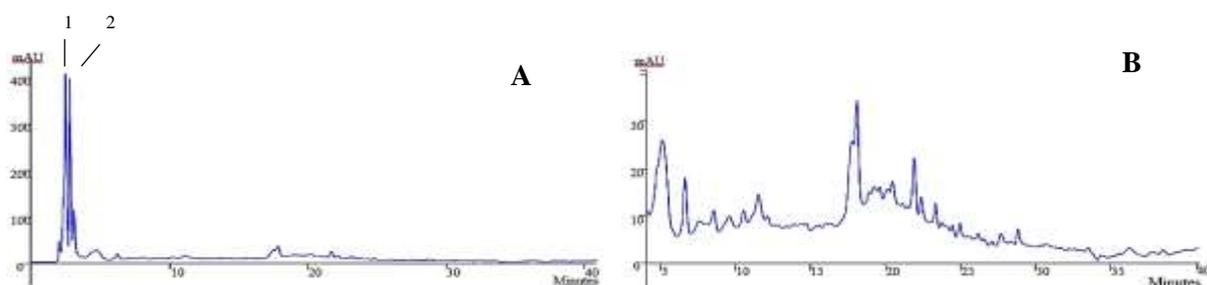


Figura 16. Perfil cromatográfico obtido em HPLC. Calos de *Physalis peruviana* L. obtidos do explante folha cultivados *in vitro* em meio suplementado com 4,44  $\mu$ M de BAP (A). Ampliação dos cromatogramas dos calos entre 5 e 40 minutos (B). Fonte: Autora (2018).

Os cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos de folhas, caule e raízes de *P. peruviana* evidenciou que o perfil fitoquímico variou entre os ambientes de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação. Em todas as amostras, independente do ambiente, foi possível verificar um perfil diferente, com tendência na síntese de metabólitos majoritários representados pelo pico 1 e 2 até os 4 minutos de retenção (Figura 17 - A, E, G). Após esse período verificou-se que os tecidos de *P. peruviana* oriundas de casa de vegetação apresentou um perfil químico complexo, evidenciando pela diversidade de metabólitos quando comparados àqueles provenientes do cultivo *in vitro*.

Comparando os tempos de retenção nos cromatogramas, pode-se observar a presença de alguns picos em comum nos dois ambientes analisados, sendo estes: pico 3, em todos os tecidos, exceto caule em casa de vegetação e folha *in vitro*; picos 4, 5 e 10 em todos os tecidos analisados, exceto em folhas *in vitro*; pico 6 em caule nos dois ambientes e em raiz em casa de vegetação; pico 11, em todos os tecidos, exceto no caule *in vitro*; pico 12 em folhas provenientes de ambos os cultivos e em caule em casa de vegetação (Figura 17 – B, D, F, H). Os picos 7, 8 (rutina) e 9 foram produzidos intensamente em folhas de *P. peruviana* em casa de vegetação (Figura 17 – A), e estão ausentes nos demais tecidos e nos explantes oriundos do ambiente *in vitro*.

Conforme observado nesse trabalho, a interferência na biossíntese dos metabólitos secundários nos dois ambientes sugere uma relação com os fatores de estresse, tais como radiação ultravioleta, luminosidade, disponibilidade hídrica, mudanças de temperatura e composição da atmosfera, aos quais as plantas foram expostas na casa de vegetação quando comparado ao ambiente *in vitro*. Esses fatores têm relação direta com a função fisiológica que a planta desenvolve para proteger-se de estresses ambientais (CASTRO et al., 2005) e podem interferir tanto na qualidade quanto na quantidade dos metabólitos secundários produzidos (LUCCHESINI et al., 2009).

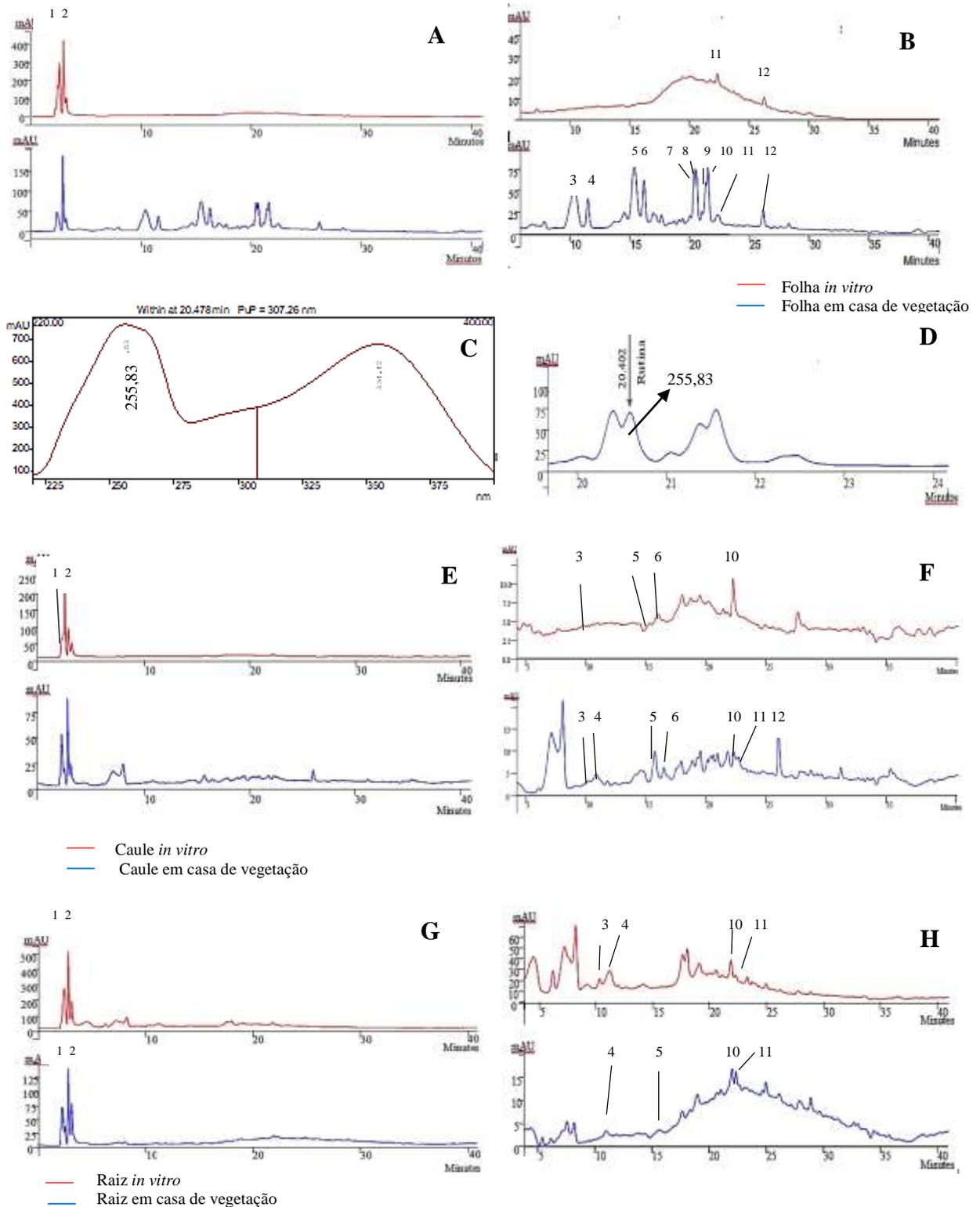


Figura 17. Perfil cromatográfico de *Physalis peruviana* L. obtido em HPLC. Folha *in vitro* e em casa de vegetação (A). Ampliação dos cromatogramas da folha *in vitro* e em casa de vegetação entre 5 e 40 min (B). Espectro de absorção UV/VIS referente ao pico da rutina com tempo de retenção 20,40 minutos e absorção máxima para a rutina ( $\lambda = 255,83$  nm) (C, D). Caule *in vitro* e em casa de vegetação (E). Ampliação dos cromatogramas do caule *in vitro* e em casa de vegetação entre 5 e 40 min (F). Raiz *in vitro* e em casa de vegetação (G). Ampliação dos cromatogramas da raiz *in vitro* e em casa de vegetação entre 5 e 40 minutos (H). Fonte: Autora (2018).

Existem poucas informações na literatura a respeito da constituição química do gênero *Physalis* envolvendo extratos de folhas, caule, raiz e calos oriundos de plantas cultivadas *in vitro*, embora os frutos de espécies do gênero tenham sido amplamente estudados. Dentre os padrões analisados, a caracterização química realizada em CLAE detectou o flavonoide rutina (pico 8) no extrato foliar de *P. peruviana* cultivadas em casa de vegetação (Figura 17-B, D). Houve sobreposição dos picos 7 e 8 e uma nova injeção para enriquecer o extrato com o padrão da rutina foi realizada, proporcionando o aumento no pico de forma a evidenciar a presença desse composto (Figura 17 - D).

A ocorrência do flavonoide rutina em *P. peruviana*, observada neste trabalho, foi relatada para outras espécies do gênero. Em *P. pubescens* cultivadas em campo, Escobar et al. (2016) obteve rutina em extratos foliares e Wu et al. (2009) relatou a ocorrência deste metabólito em frutos. Camlofski et al. (2014), identificou a rutina como o flavonol majoritário em cálices de frutos de *P. angulata*, confirmado pelo espectro CLAE/DAD. Pérez-Castorena et al. (2013) verificaram altas concentrações de rutina em extrações realizadas nos cálices dos frutos e nas raízes de *P. philadelphica*.

A rutina tem sido amplamente pesquisada nas últimas décadas e seus resultados de grande interesse para a indústria farmacêutica, por suas propriedades citoprotetora, vasoprotetora e antioxidante (ARAUJO, 2012), inclusive estudos realizados apontam esse flavonoide com potencial antioxidante mais elevado quando comparado à vitamina C (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Além disso, a rutina e seus derivados são eficazes no tratamento de doenças cardiovasculares, sendo o principal composto ativo em alguns medicamentos (ERLLUND, 2004).

#### 4.7.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) por técnica espectrofotométrica

Os teores de compostos fenólicos totais calculado com base na equação obtida da curva padrão ácido gálico (Figura 18), expressos em equivalente de ácido gálico por 100 g presentes em extratos de folhas, caules e raízes de *P. peruviana* cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação e de calos provenientes das folhas *in vitro* cultivadas em 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP estão descritos na Tabela 8.

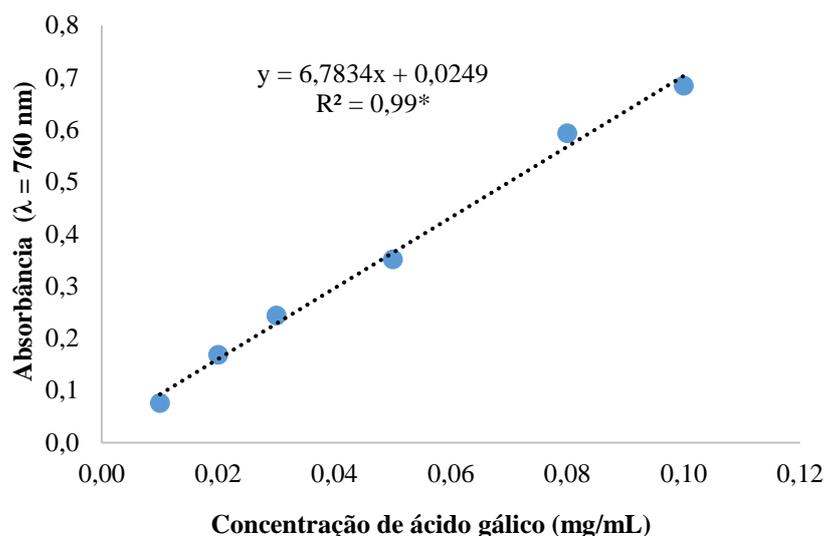


Figura 18. Curva padrão do ácido gálico para quantificação dos compostos fenólicos totais em folha, caule e raiz de *Physalis peruviana* L., cultivada *in vitro* e em casa de vegetação. UEFS, Feira de Santana – BA, 2018.

Tabela 8. Compostos fenólicos totais (CFT) expressos como equivalentes de ácido gálico (g AGE.100g<sup>-1</sup>) por grama de extrato seco em amostras de caule, folha e raiz de *Physalis peruviana* L. submetidas ao cultivo *in vitro* e em casa de vegetação e dos calos obtidos de explantes foliares cultivados *in vitro* em meio suplementado com 4,44 μM de BAP. Feira de Santana - BA, 2018.

Extratos	Tipo de ambiente	
	<i>In vitro</i>	Casas de Vegetação
Folha	1,94 ± 0,21 Bb	4,75 ± 0,28 Aa
Caule	1,20 ± 0,14 Cb	1,76 ± 0,11 Ca
Raiz	2,76 ± 0,33 Aa	2,36 ± 0,17 Ba
Calos	3,05 ± 0,07 A	-

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O extrato das folhas e caules provenientes de plantas de *P. peruviana* cultivadas *in vitro* apresentaram uma concentração de compostos fenólicos de 1,94 mg AGE.100g<sup>-1</sup> e de 1,20 mg AGE.100g<sup>-1</sup>, respectivamente, diferindo dos extratos provenientes do mesmo tipo de explante, cultivados em casa de vegetação, onde a concentração desses compostos foi de 4,75 mg AGE.100g<sup>-1</sup> e 1,76 mg AGE.100g<sup>-1</sup>. Para o explante raiz, a concentração de compostos fenólicos totais não diferiu nos ambientes de cultivo, alcançando uma média de 2,76 mg de AGE.100g<sup>-1</sup> *in vitro* e 2,36 mg AGE.100g<sup>-1</sup> em casa de vegetação. Os calos obtidos de explantes foliares proporcionaram uma concentração de compostos fenólicos totais de 3,05 mg AGE.100g<sup>-1</sup> (Tabela 8).

Quando se analisou a concentração de compostos fenólicos totais em amostras de tecidos submetidas as condições de cultivo *in vitro*, verificou-se que os extratos de raiz e de

calos são significativamente superiores ao de folhas e caules, os quais diferem entre si (Tabela 8).

Já na casa de vegetação todos os extratos das amostras diferiram entre si quanto a concentração desses compostos, sendo a maior concentração de compostos encontradas nos extratos foliares (Tabela 8). Em ambientes cuja luminosidade é mais intensa, a produção de compostos fenólicos aumenta pela função exercida na proteção quanto ao excesso de raios ultravioletas. Assim, uma maior síntese de compostos presentes no tecido foliar de *P. peruviana* quando cultivadas em casa de vegetação indicam a maior necessidade desse tecido em proteger-se contra raios ultravioletas, insetos, vírus, bactérias e fungos e inibir enzimas responsáveis pelo processo oxidativo em relação aos demais tecidos.

Os raios ultravioletas podem influenciar a concentração dos compostos fenólicos, favorecendo sua produção quando as plantas sofrem maior estresse ambiental (DUMAS et al., 2003), o que justifica a maior concentração nos extratos provenientes das amostras de *P. peruviana* cultivadas em casa de vegetação. De acordo com Christodoulakis et al. (2009), a produção desses compostos representa uma ação defensiva da planta a favor de sua adaptação. Por outro lado, quando submetidas ao cultivo *in vitro*, todas as condições de cultivo e fatores nutricionais foram controladas, o que pode ter proporcionando menor síntese dos metabólitos secundários pela *P. peruviana* neste ambiente.

O fato das folhas produzirem maior quantidade de compostos fenólicos pode estar ligado à maior exposição às variações dos fatores abióticos, como luminosidade, temperatura, quando comparada aos demais tecidos analisados. De acordo com Silva et al. (2017), quanto maior a concentração de compostos fenólicos sintetizados pelas plantas maior a proteção contra a radiação ultravioleta emitida pelo sol, e maior a probabilidade desses compostos serem utilizados em preparo de extratos com ação fotoprotetora pela indústria farmacêutica. Os autores desenvolveram estudos com extratos secos de folhas e caule de *P. peruviana* e de folhas secas de *P. ixocarpa* cultivadas em campo e constataram a presença de maior concentração de compostos fenólicos em folhas de *P. peruviana* (59,97 mg AGE.100g<sup>-1</sup>) em comparação ao caule 46,85 mg AGE.100g<sup>-1</sup> e altas concentrações nas folhas de *P. ixocarpa* (64,95 mg AGE.100g<sup>-1</sup>).

Resultado contrário ao descrito para a *P. peruviana* nesse trabalho, foram obtidos por Tavano et al. (2009) em *Matricaria recutita* L., cultivadas *in vitro*, onde as raízes apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparados ao cultivo em campo, e

para o tecido calo, o qual apresentou concentração de compostos fenólicos maior em relação aos demais tecidos analisados.

Diversos estudos relataram a ocorrência de compostos fenólicos no gênero *Physalis* com variações em função da espécie, do estado de maturação do fruto e/ou métodos empregados para a avaliação: Severo et al. (2010) relataram ter encontrado em frutos de *P. peruviana* um conteúdo de compostos fenólicos variando de 169,19 a 210,41 mg AGE.100g<sup>-1</sup> em função do estágio de maturação. Rutz et al. (2012) em estudos com essa espécie também encontraram concentrações altas (146,07 mg AGE.100g<sup>-1</sup>) em frutos, enquanto Rop et al. (2012) verificaram em extratos metanólicos de frutos 7,62 mg AGE.100g<sup>-1</sup>. Rothenbach et al. (2008) encontraram valores de compostos fenólicos totais em diferentes extratos de *P. peruviana* variando entre 14,53 e 90,80 mg AGE.100g<sup>-1</sup>. Wu et al. (2006), constataram que os compostos fenólicos obtidos para o extrato metanólico do fruto fresco de *P. peruviana* foi de 57,9 mg AGE.100g<sup>-1</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

A expressão morfogênica *in vitro* de *Physalis peruviana* L. é influenciada tanto pelo tipo de explante quanto pelo BAP.

A cultura de tecidos é uma alternativa viável para a propagação de *P. peruviana* via organogênese direta e indireta.

O perfil bioquímico de *P. peruviana* não diferem entre as plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, com exceção do teor de açúcares solúveis totais que é maior em folhas cultivadas *ex vitro*.

O tecido foliar apresenta maior teor de proteínas e açúcares redutores quando comparado aos demais tecidos analisados, independente do ambiente de cultivo.

O perfil fitoquímico de *P. peruviana* varia nos ambientes de cultivo. No ambiente *ex vitro* há maior produção de compostos fenólicos, e a rutina é produzida em folhas de plantas cultivadas em ambiente *ex vitro*.

Calos *in vitro* são fonte de compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS

- AFROZ, F. et al. *In vitro* shoot proliferation and plant regeneration of *Physalis minima* L. a perennial medicinal Herb. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, Bangladesh, v. 44, n. 4, p. 453-456, 2009.
- ALVES, J. M. A. et al. Pinhão-manso: uma alternativa para produção de biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira. **Agroambiente on-line**, Boa Vista, v. 2, n. 1, p. 57-68, 2004.
- ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, 58).
- ARAUJO, M. E. M. B. **Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática**. 2012, 78 f. Dissertação (Mestrado - Ciências da Saúde) - Universidade São Francisco, São Paulo, 2012.
- ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 1, p. 16-22, 2008.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n.1, p. 1-15, 1949.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-24, 2011.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1101-1103, 2007.
- BERTONCELLI, D. J; OLIVEIRA, M. de C. **Avaliação de diferentes explantes e combinações de reguladores vegetais (BAP e ANA) no cultivo *in vitro* de *Physalis pubescens* L.** In: Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais – UTFPR, Campus Dois Vizinhos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, Paraná, 2010.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e frequências de irrigação e tipos e volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental**.

2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BONILLA, M. L.; ESPINOSA, K. **Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva (*Physalis peruviana* L.)**. 2003. 95 f. Monografía (Trabajo de pregrado de Ingeniería Agronómica) - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 2003.

BORGES, A. L., SOUZA, L. da S.; TRINDADE, A. V. **O cultivo da bananeira**. 2. ed. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Floricultura, 2004. 279 p.

BORGHESAN, M. et al. 2003. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética das plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 183- 260.

CAMLOFSKI, A. M. O. et al. **Avaliação dos compostos bioativos e caracterização das pectinas do fruto de *Physalis angulata* L.** 2014. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

CARDOSO, N. da S. N. **Avaliação da *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão sob diferentes formas de cultivo: crescimento, atividade antimicrobiana e compostos fenólicos**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

CARVALHO, L. M. et al. 2006. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 24, n. 3, p. 289-294, 2006.

CARVALHO, A. C. P. P. de. et al. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

CASTRO, P. R. C. et al. **Manual de Fisiologia Vegetal**. 1. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. 651 p.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281–1287, 2005.

CHAVES, A. C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. na região de Pelotas, RS**. 2006. 65 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

CHRISTODOULAKIS, N. S.; LAMPRI, P.; FASSEAS, C. Structural and cytochemical investigation of the leaf of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*), a droughtresistant

alien weed of the Greek flora. **Australian Journal of Botany**, Clayton South, v. 57, n. 5, p. 432-438, 2009.

CID, B. L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, B. L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 15-49.

CONTRERAS, I.; ALMEIDA, J. Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). **Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes**, Merida, v. 45, n. 1, p. 61-64, 2003.

COSTA, E. et al. Efeitos da ambiência, recipientes e substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro-amarelo em Aquidauana – MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 236-244, 2009.

COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. *In vitro* propagation of *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

COSTA, A. S. da M. et al. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Revista Scientia Plena**, São Cristovão, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2015.

CORPORAÇÃO COLOMBIA INTERNACIONAL. Universidade de Los Andes y Departamento de Planeación Nacional. **Análisis internacional del sector hortofrutícola para Colombia**. Bogotá: El Diseño, 1994. 165 p.

D'ARCY, W. G. 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: **Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution**. Eds. Hawkes, J. G., Lester, R.N., Nee, M. and Estrada, n. 75-137. London: Kew Royal Botanical Gardens.

DECETTI, S. F. C. et al. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 341-344, 2008.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana***: alterações anatômicas e fisiológicas. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

DILL, L. **Estratégias de micropropagação de *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.) WIJSMAN e *Rosmarinus officinalis* L.** 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

DIN, J. et al. Physiological and agronomic response of canola varieties to drought estresse. **J The Journal of Animal & Plant Sciences**, Lahore, v. 21, n. 1, p. 78-82, 2011.

DUMAS, Y. et al. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Nova Jersey, v. 83, n. 5, p. 369–382, 2003.

- ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v.3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- ERIG, M. W; SCHUCH, A. C. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, Helsinki, v. 24, n. 10, p. 851 – 874, 2004.
- ESCOBAR, B. M. et al. Análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas e frutos de *Physalis pubescens*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 2, 2016.
- FELICIANO, E. A. **Solanaceae A. Juss. da Serra Negra, Rio Preto, Minas Gerais: tratamento taxonômico e similaridade florística**. 2008. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2008.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FISCHER, G. G. Crecimiento y desarrollo. Em: FLÓREZ, V.; FISCHER, G. G; SORA, A. D. (Eds.). **Producción, pos cosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana*)** - Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 9-26, 2000.
- FISCHER, P. J. G.; ALMANZA-MERCHÁN, D. M. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 001-015, 2014.
- FLORES, R. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.
- FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. cap. 7, p. 105-124.
- FREITAS, T. A. S.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A. Dinâmica de raízes de espécies arbóreas: visão da literatura. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 133-142, 2008.
- GARCÍA-OSUNA, H. T. et al. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Saltillo, v. 12, n. 1, p. 2301-2311, 2015.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-28.

GIACOMIN, L. L. **Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Solanum* sect. *Gonatotrichum* Bitter (Solanoideae, Solanaceae) no Brasil**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES E. D. et al. **Aspectos técnicos do cultivo de *Physalis* para o Sul de Minas**. Belo Horizonte. EPAMIG, 2012. 6 p. (Circular Técnica, 162).

GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L. S. Micropropagação do porta-enxerto tangerina Sunki (*Citrus sunki*) a nível comercial. In: 2º SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1987, **Anais...** Brasília: 1987, p.10.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética das plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183- 260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2016. 44 p.

HIDDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 36, p. 27–33, 1994.

INTZAAR, S.; AKRAM, M.; AFRASIAB, H. High Frequency Multiple Shoot Formation of Pygmy Groundcherry (*Physalis minima*): An Endangered Medicinal Plant. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 15, n. 4, p. 755-760, 2013.

JACKSON, S.D. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 1, p. 1-8, 1999.

JAHIRHUSSAIN, G. et al. *In vitro* Shoot multiplication of *Physalis minima* L. - an important Medicinal Herb. **Journal of Advanced Applied Scientific Research**, Tamilnadu, v. 1, n. 3, p. 49- 58, 2016.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1. ed. New York: Mc Graw Hill Book. 1940. 523 p.

KANECHI, M. et al. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, 1998.

KAZI, N. A. Polyploidy in Solanaceous crops. **Asian Journal of Multidisciplinary Studies**, Pune, v. 3, n. 4, p. 69-73, 2015.

- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.
- KHAN, W.; BAKHT, J. Development of efficient and optimized protocol for rapid micropropagation of *Physalis ixocarpa*, a medicinal herb. **Pakistan Journal of Weed Science Research**, Paquistão, v. 21, n. 3, p. 381-391, 2015.
- KUMAR, O. A., RAMESH, S.; TATA, S. S. Establishment of a Rapid Plant Regeneration System in *Physalis angulate* L. through axillary meristems. **Notulae Scientia Biologicae**, Romania, v. 7, n. 4, p. 471-474, 2015.
- LANNA, N. de B. L. et al. Germinação de *Physalis angulata* e *P. peruviana* em diferentes substratos. **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 6, n. 3, p. 75-82, 2013.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, B. L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1.ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2010. p. 103-128.
- LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, suplemento 2, p. 669-671, 2007.
- LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.
- LIMA, C. S. **Fenologia, sistemas de tutoramento e produção de *Physalis peruviana* na região de Pelotas, RS**. 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
- 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-BRITO, A. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* GIUL. Subsp. *mucugensis***. 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* Morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-510, 2011.
- LIMA-BRITO, A. et al. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016.
- LINNAEUS, C. 1753. **Species plantarum**. 1. ed. Stock holm. Reimpressão, 1957. Londres: The Ray Society.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, Washington, v. 30, p. 421–327, 1981.
- LOUREIRO, M. B. et al. Caracterização morfoanatômica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n. 6, p.1093-1101, 2013.
- LUCCHESINI, M. et al. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D. C. adult plants for the production of phytochemical compounds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 484-490, 2009.
- LUCIANI, G. F. et al. Effects of explantes and grown regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 2, p. 39-143, 2006.
- LUIS, B. M. S. ***Physalis peruviana*: ensaios de cultura in vitro e hibridação**. 2016, 115 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal) – Faculdade de Ciência e Biotecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.
- MADRC. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, 2007. **Sistema de Inteligência de Mercados: Informacion de monitoreo internacional**. Disponível em: <[http://agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/2006427154348/uchuvamazo.pdf](http://agronet.gov.co/www/docs_agronet/2006427154348/uchuvamazo.pdf)>. Acesso em: 30 dez. 2016.
- MARTINS, J. R. et al. Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 64-69, 2010.
- MELO, M. **Mapa-múndi vetorizado**. Disponível em <<http://vetoresdownload.blogspot.com.br/2012/05/mapa-mundi-vetorizado.html>>. Acesso em 12 de mar. 2017.
- MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *Bauhinia forficata* Link shoot Regeneration: Histological: Analysis of Organogenesis Pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 4, p. 431-436, 2000.
- MENEGHETTI, E. C. **Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias morfogênicas na micropropagação de *Neoregelia* sp.** 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e bioquímica de plantas) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, 2015.
- MEZZALIRA, E. J. **Germinação, desenvolvimento inicial e concentração de pigmentos em mudas de *Physalis* (*Physalis* spp) produzidas em diferentes ambientes**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R. C. et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, Oxon, v. 82, n. 3 p. 409-416, 2003.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA, R. M. et al. **Avaliação de germinação e contaminação de *Physalis* sp. em diferentes concentrações de meio MS *in vitro***. XIX CIC. XII ENPOS. II Mostra Científica, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2010.

MOSHKOV, I. E. et al. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1, 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 277-282.

MOURA, T. L. de. et al. Organogênese *in vitro* de *citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MOURA, P. H. A. **Cobertura plástica e densidade de plantio na produção e qualidade das frutas de *Physalis peruviana* L.** 2013. 50 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

MOURA, R. C. et al. Micropropagação de *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE). In: **Anais... 20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, 2016.

MULLER, T. S. **Fisiologia e metabolismo da embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

MUNIZ, J. et al. Sistemas de condução para cultivo de *Physalis* no planalto Catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 830-838, 2011.

MUNIZ, J. et al. Principais pesquisas realizadas com o cultivo de *Physalis* no Sul do Brasil. In: Reunião Técnica da Cultura da *Physalis*, Lages. **Anais...** Lages: UDESC, 2012, p. 56-79.

MUNIZ, J. **Micropropagação e aclimatização de *Physalis peruviana* e *Physalis alkekengi***. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

MUNIZ, J. et al. Crescimento vegetativo e potencial produtivo de fisális. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 14, n. 1, p. 15-23, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 4, p. 473-497, 1962.

NEPOMUCENO, C. F. **Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Bent.) J. F. B. Pastore**. 2012. 164 f. Tese. (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

NIKAN, T. D.; SHHITOLE, M. G. *In vitro* culture of Safflower L. cv Bhima: initiation growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 55, n.1, p. 15-22, 1999.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NOGUEIRA et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p. 44-48. 2008.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, L. M. et al. Estabelecimento *in vitro* e crescimento inicial de *Physalis angulata* (Solanaceae). **Sitientibus: Serie Ciências Biológicas (SCB)**, Feira de Santana, v. 13, p. 13-17, 2013.

OLIVEIRA, T. B. de. et al. Pigmentos fotossintéticos em folhas de *Capsicum annuum* L. adubadas com diferentes fontes e doses de nitrogênio. In: 65° REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 2013, Recife. **Anais...Resumos da 65ª Reunião Anual da SBPC**, Ciência para o Novo Brasil, 2013. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

OLIVEIRA, J. A. R. de. **Multiplicação *in vitro* e estaquia de *Physalis angulata* L.** 2014. 39 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Vegetal) - Universidade de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, 2014.

OLMSTEAD, R. G.; BOHS, L. A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982–2006. p. 255–268 In: SPOONER, D.M.; BOHS, L.; GIOVANNONI, J.; OLMSTEAD, R.G.; SHIBATA, D. (eds.), Solanaceae VI: Genomics Meets Biodiversity. Proceedings of the Sixth International Solanaceae Conference. **Acta Horticulturae**, Leuven, Bélgica. International Society for Horticultural Science.

OLMSTEAD, R. G. et al. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, Vienna, v. 57, n. 4, p. 1159-1181, 2008.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2003, Bento Gonçalves. **Anais...Bento Gonçalves**, 2003. p. 9-14.

PEI, Z. F. et al. Silicon improves the tolerance to water-deficit estresse induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 1, p. 106-115, 2010.

PEREIRA, J. E. S. et al. Indução de massas celulares embriogênicas em *Physalis* sp. a partir de discos caulinares de plântulas estabelecidas *in vitro*. In: **Anais... Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 24, n. 1, 2006.

PEREIRA, D. M. S. **Cultivo *in vitro* e análise qualitativa da fisalina D em *Physalis angulata* L.** 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas de regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.

PÉREZ-CASTORENA, A. L. et al. Chemical study of calyxes and roots of *Physalis solanaceous*. **Records of Natural Products**, Gebse, v. 7, n. 3, p. 230-233, 2013.

PINHEIRO, M. V. M. et al. Micropropagação de antúrio ‘IAC Eidibel’ por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 133- 142, 2009.

PONCE, O. V.; DIAZ, M. M; ARANDA, P. D. La familia *Solanaceae* en Jalisco – El género *Physalis*. **Colección Flora de Jalisco**. Instituto de Botánica. Departamento de Botánica y Zoología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuaria da Univerdad de Guadalajara, Mexico. 1. ed. 2003. 130 p.

PUENT, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional frit: Review. **Food Research Internacional**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, 2011.

RAMAR, K.; AYYADURAI, V.; ARULPRAKASH, T. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L. An important medicinal plant. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 3, n. 3, p. 456-464, 2014.

RAMASUBBU, L. R. Micropropagation and estimation of biochemical constituents in *Pedaliium murex* L. and *Physalis angulata*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, New Delhi, v. 2, n. 4, p. 226-230, 2009.

REBOUÇAS, F. S. **Cultivo *in vitro* de plantas medicinais: *Ocimum basilicum* L. e *Cissus sicyoides* L.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

ROCHA, J. F. et al. Calogênese em insulina vegetal (*Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 19; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. **Anais...** Recife: UFRPE, 2013.

ROCKENBACH, I. I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Revista Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.

RODRIGUES, E. et al. Mineral sand essential fattacids of the exotics fruit *Physalis peruviana*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 3, p. 642-645, 2009.

- RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.
- RODRIGUES, S. T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.587-590, 2011.
- RODRIGUES, F. A. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana*. **BioScience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, 2013.
- ROP, O. et al. Bioactive content and antioxidant capacity of cape gooseberry fruit. **Central European Journal of Biology**, Europa, v. 7, n. 2, p. 672-679, 2012.
- RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura da *Physalis***. Lages: UFPel CAV/UDESC, 2008. 100 p.
- RUTZ, J. R. et al. Geleia de *Physalis peruviana*, L.: caracterização bioativa, antioxidante e sensorial. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 3, p. 369-375, 2012.
- SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root developed. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 32, n. 6, p. 741- 757, 2013.
- SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Comunicado Técnico, 99 Belém – Pará: Embrapa/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. 6 p.
- SANTOS-SEREJO, J. A. dos et al. Micropropagação da Bananeira. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. ver. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- SCHNEID, L. 2008. Agrônoma testa cultivo de nova fruta na região. **Diário Popular**, Pelotas, 8 jun. 2008. Rural, p. 27.
- SEVERO, J. et al. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis* (*Physalis peruviana*, L.) durante o amadurecimento e o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 16, n. 1-4, p. 77-82, 2010.
- SHEEBA, E., PARVATHY, S., PALANIVEL, S. Direct regeneration from leaves and nodes explantes of *Physalis minima* L. **European Journal of Applied Sciences**, Dubai, v. 2, n. 2, p. 58-61, 2010.
- SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 541-547, 2003.
- SILVA, A. L. L. da. et al. Organogênese direta de explantes cotiledonares e regeneração de plantas de morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 992-995, 2006.

SILVA, A. L. L. et al. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.

SILVA-JÚNIOR, J. M. da. **Caracterização anatômica e bioquímica de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagadas em diferentes ambientes**. 2009. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.

SILVA, L. S. et al. Composição química e atividade fotoprotetora de extratos de espécies de *Physalis* (Solanaceae). 12º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2017.

SILVEIRA, D. C. et al. Obtenção de explantes assépticos a partir da germinação *in vitro* de *Physalis peruviana* - Solanaceae. In: XVII SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. XV MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X MOSTRA DE EXTENSÃO 'CIÊNCIA, REFLEXIVIDADE E (IN) CERTEZAS', 2012. XVII SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. XV MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. X MOSTRA DE EXTENSÃO. **Anais...** Cruz Alta: UNICRUZ, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, M. B. P. et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam. v. 459, n. 1, p.107-112, 2003.

/

SOARES, M. B. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, Amsterdã, v. 6, n. 3, p. 408-114, 2006.

SOUZA, C. M. P. et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde de Campina Grande- Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

STEHMANN, J.R., MENTZ, L.A., AGRA, M.F., VIGNOLI-SILVA, M., GIACOMIN, L. 2010. Solanaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000225>>. Acesso em: 29 dez. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

\_\_\_\_\_. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TANAN, T. T. et al. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in *Physalis angulata* L. leaves using different methodologies. **Journal of Agricultural Science**, North York, v. 9, n. 11, p. 117-122, 2017.

TAVANO, E. C. da R. et al. Conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides em plantas de camomila (*Matricaria recutita* L. - Asteraceae) cultivadas *in vivo* e *in vitro*. **Naturalia**, Rio Claro, v. 32, n. p. 67-77, 2009.

TAVARES, V. de L. **Cultura de tecidos e atividade antioxidante de *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.** 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

TERZI, R. et al. Impact of soil drought estresse on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2010.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 26, p. 618-631, 2008.

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 47-57, 2000.

VELASQUEZ, H. J. C.; GIRALDO, O. H. B.; ARANGO, S. S. P. Estudio preliminar de La resistência mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana*). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 60, n. 1, p. 3785-3796, 2007.

VIDAL, J. O. **Micropropagação e aclimatização de camapu (*Physalis angulata*).** 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e sustentabilidade na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 135-145, 2009.

VILLEGAS, I. C. I. El cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana*). Proyecto Microcuencia Plantón – **Pacayas Boletín Técnico** nº. 10. San José, Costa Rica, 2009.

WHATLEY, F. H.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas.** São Paulo: EPUEDUSP, v. 30, 1982. 101 p.

WHITSON, M. Calli *Physalis* (Solanaceae): a new genus from Southeastern USA. **Rhodora**, Cummington, v. 114, n. 958, p. 133-147, 2012.

WU, S. J. et al. Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Pangborn, v. 47, n. 6, p. 1132-1138, 2009.

WUBE, A. A. et al., Constituents of the stem bark of *Discopodium penninervium* and their LTB4 and COX-1 and -2 inhibitory activities. **Phytochemistry**, Roma, v. 69, p. 982-987, 2008.

YEMM, E. W; WILLIS, A. J. The Estimation of Carbohydrate in the Plant Extract by Anthrone Reagent. **Journal of Biochemistry**, Cochester, v. 57, n. 5, p. 508-514, 1954.

YÜCESAN, B. B. et al. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 39, n. 5, p. 797-806, 2015.