



**RAQUEL BEZERRA CHIAVEGATTO**

**VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE MITÓTICO  
E ULTRAESTRUTURA DE CALOS DE  
*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae)**

**LAVRAS-MG**

**2014**

**RAQUEL BEZERRA CHIAVEGATTO**

**VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE MITÓTICO E  
ULTRAESTRUTURA DE CALOS DE *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.  
(Malpighiaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Helena Techio - DBI/UFLA  
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro - UFSJ

**LAVRAS-MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Chiavegatto, Raquel Bezerra.

Viabilidade celular, índice mitótico e ultraestrutura de calos de  
*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae) / Raquel Bezerra  
Chiavegatto. – Lavras : UFLA, 2014.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Cerrado. 2. Embriogênese somática. 3. Metabólitos  
secundários. 4. Murici-cascudo. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD – 583.214

**RAQUEL BEZERRA CHIAVEGATTO**

**VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE MITÓTICO E  
ULTRAESTRUTURA DE CALOS DE *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.  
(Malpighiaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2014

Dr. Geraldo Alves da Silva

UNIFAL

PhD. Renato Paiva

DBI/UFLA

Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro

UFSJ

Orientadora: Dra. Vânia Helena Techio - DBI/UFLA

**LAVRAS-MG**

**2014**

Dedico este trabalho aos meus familiares em especial ao meu pai, meu grande mestre.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sua presença em cada instante. Sobretudo nas horas mais complicadas, de mais angústia, mostrou-Se na força para seguir em frente sem pensar em desanimar.

À minha família pelo apoio e incentivo. Em especial ao meu pai por estar sempre presente e participativo, por acreditar e fazer sempre mais que o possível para que meus sonhos se tornem reais.

À Universidade Federal de Lavras e a todos do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade dos estudos.

À minha orientadora Vânia Helena Techio, pela presença, confiança e por acreditar em meu trabalho. Aprendi muito com seus ensinamentos e profissionalismo.

À Ana Hortência, minha coorientadora, pelas valiosas contribuições.

Aos membros da banca prof. Geraldo Alves da Silva e prof. Renato Paiva pela disponibilidade na contribuição deste trabalho.

À todos do Laboratório de Citogenética Vegetal (Departamento de Biologia) pela paciência e ensinamentos. Em especial a Mayra que me ajudou em todas as etapas deste trabalho.

À Marlúcia pelas dicas e principalmente na ajuda nas análises ultraestruturais.

Ao Laboratório de Anatomia e Histologia Vegetal (Departamento de Biologia), ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal) e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (Departamento de Fitopatologia) da UFLA pela infraestrutura na montagem do experimento.

À Claudinha pelo auxílio na análise de microscopia eletrônica de transmissão.

À minha família de Lavras, Nayara, Paula e Daniele, obrigada por me receber de braços abertos, pela amizade sincera e momentos de descontração.

Aos meus amigos da Botânica Aplicada, em especial Gabriel, Jaiane, João, Katiuscia, Luciana, Luiz, Mairy, Marcio, Marinês, Nayara e Suelen, que durante estes dois anos nos tornamos uma grande família, sem vocês por perto não teria a menor graça.

**Muito Obrigada!**

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa  
que a fez tão importante.”*

*O pequeno príncipe*

## RESUMO

*Byrsonima verbascifolia* L. (DC.), conhecida popularmente por murici-cascudo, é uma espécie do Cerrado pertencente à família Malpighiaceae, que apresenta propriedades antioxidante e cicatrizante. Devido à presença de um pirênio indeiscente e de um tegumento extremamente lignificado, *B. verbascifolia* tem baixa taxa de germinação e a cultura de tecidos é uma técnica utilizada para a sua propagação. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade celular, o índice mitótico, a ultraestrutura e a histoquímica dos calos de *B. verbascifolia* em cada fase da cinética de crescimento para seleção de células com maior capacidade embriogênica. Os calos foram induzidos a partir de explantes foliares de 0,25 cm<sup>2</sup> de área e inoculados em meio MS, com 4,52µM de 2,4-D e 4,44µM de BAP. A cinética de crescimento dos calos foi obtida a partir de pesagens do material inoculado fresco e seco, a partir do 10º dia da inoculação, até ser atingida a fase de declínio, em intervalos de 10 dias. As amostras de calos frescos, obtidas ao longo da cinética de crescimento foram monitoradas através das análises da viabilidade celular, utilizando o método da dupla coloração FDA-IP, índice mitótico, usando o DAPI, as análises ultraestruturais, por meio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão, e teste de histoquímica, pelos testes com o lugol e azul de toluidina. Foram obtidos calos friáveis, cuja cinética de crescimento apresentou quatro fases distintas, *lag* (até o 30º dia), exponencial (31º ao 70º dia), linear (71º ao 100º dia) e declínio (101 ao 120º), representada pela equação de regressão  $y = -9E-06x^3 + 0,0015x^2 - 0,0466x + 0,443$  ( $R^2 = 0,9391$ ). A máxima viabilidade celular foi observada aos 20 dias da fase *lag* e 40 dias da fase exponencial. O maior índice mitótico foi observado aos 20 dias da fase *lag* e aos 50 dias da fase exponencial. De acordo com as análises ultraestruturais entre o período de 20 a 30 dias foram observadas células com características meristemáticas, como o formato isodiamétrico, justapostas, com pequenos vacúolos, parede celular delgada e presença de amiloplastídeos, comprovada pelos testes de histoquímica. Os calos aos 120 dias apresentaram as menores porcentagens de células viáveis e índice mitótico, sendo formado, predominantemente por células alongadas. A viabilidade celular, índice mitótico e a morfologia das células dão respaldo a cinética de crescimento das células de *B. verbascifolia*, mostrando que o subcultivo, bem como o momento ideal para iniciar a suspensão celular dos calos de *B. verbascifolia* devem ser realizados até os 70 dias após a inoculação, no qual apresentaram alta viabilidade celular, índice mitótico de células isodiamétricas com características embriogênicas, sendo possível selecionar células com maior capacidade embriogênica.

**Palavras-chave:** Cerrado. Embriogênese somática. Metabólitos secundários. Murici-cascudo

## ABSTRACT

*Byrsonima verbascifolia* L. (DC.), popularly known as murici-cascudo, is a species of the Cerrado belonging to the Malpighiaceae family which has antioxidant and healing properties. Due to the presence of a indehiscent pyrene and a highly lignified tegument, *B.verbascifolia* have low germination rate and tissue culture is a technique used for their propagation. The aim of this study was to evaluate cell viability, mitotic index, the ultrastructure and histochemistry of the callus of *B.verbascifolia* at each stage of the growth kinetics for selection of cells with higher embryogenic capacity. Callus was induced from leaf explants of 0,25 cm<sup>2</sup> and grown on MS medium with 4,52 μM of 2,4-D and 4,44 μM BAP . The growth kinetics of the callus was obtained from the fresh and dry inoculum weight measurements from the 10th day after inoculation, until reaching the declining phase at intervals of 10 days. Samples of fresh callus obtained along the growth kinetics were monitored by analysis of cell viability using the method of double FDA-PI taining, mitotic index color using DAPI, ultrastructural analysis by means of scanning and transmission electron microscopy and and histochemical test, by the tests with lugol and toluidine blue. Friable callus was obtained, whose growth kinetics presented four distinct phases, lag (until 30 th day), exponential (31th to 70th day), linear (71 th to 100 th day) and decline (101th to 120 th day), represented by the regression equation  $y = -9E-06x^3 + 0,0015x^2 - 0,0466x + 0,443$  ( $R^2 = 0,9391$ ). The maximum cell viability was observed at 20 days of lag phase and at 40 days of the exponential phase. The higher mitotic index was observed at 20 days of lag phase and at 50 days of the exponential phase. According to the ultrastructural analyses of the period of 20 to 30 days, meristematic cells with characteristics such as isodiametric shape, juxtaposed, with small vacuoles, thin cell wall and the presence of amyloplasts proven by histochemical tests were observed. Callus at 120 days showed the lowest percentage of viable cells and mitotic index formed predominantly of elongated cells. Cell viability, mitotic index and cell morphology give support the kinetics *B. verbascifolia* cell growth, showing that subculture as well as the ideal time to start a cell suspension of callus *B. verbascifolia* should be performed until 70 days after inoculation in which showed high cell viability, mitotic index and prevalence of isodiametric cells with embryogenic characteristics, allowing to select cells with higher embryogenic capacity.

**Keywords:** Cerrado. Somatic embryogenesis. Secondary metabolites. Murici-cascudo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Aspecto geral de *Byrsonima verbascifolia* em área experimental (A); Detalhe das inflorescências (B) Fonte: Castro, 2003; 1. Frutos; 2. Endocarpos esclerificados; 3. Sementes (C); 1. Endocarpo esclerificado; 2. Endocarpo rompido mostrando as sementes no interior; 3. Sementes (D). Fonte: Castro, 2012.....21
- Figura 2** Explante (A) e Aspecto geral dos calos (B-D) dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Explante inicial (A); Calos com coloração amarela (B); Calos com coloração branca (C); Calos com coloração preta (D). .....41
- Figura 3** Cinética de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. I- fase lag (0-30 dias), II- fase exponencial (31-70 dias), III- fase linear (71-100), IV- fase de declínio (101-120 dias). .....42
- Figura 4** Aspecto geral dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Fase lag: 10 dias de cultivo (A), 20 dias de cultivo (B) e 30 dias de cultivo (C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D), 50 dias de cultivo (E), 60 dias de cultivo (F) e 70 dias de cultivo (G); Fase linear: 80 dias de cultivo (H), 90 dias de cultivo (I) e 100 dias de cultivo (J); Fase de declínio: 110 dias de cultivo (K) e 120 dias de cultivo (L). .....43
- Figura 5** Viabilidade celular em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células viáveis com fluorescência verde e células inviáveis com fluorescência vermelha (A-D).....45
- Figura 6** Ciclo celular em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Núcleos interfásicos (A); Prófase (B-C); Prometáfase (D); Anáfase (E-F); Telófase (G-H). .....49
- Figura 7** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Calos de cor amarela

(A-B); Calos de cor branca (C-D); Calos de cor preta (E-F). cal: células alongadas; car: células arredondadas; carm: células arredondadas murcha. ....52

**Figura 8** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase lag: 10 dias de cultivo (A-B); 20 dias de cultivo (C) e 30 dias de cultivo (D). cad: células alongadas danificadas; cal: células alongadas; car: células arredondadas.....53

**Figura 9** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase exponencial: 40 dias de cultivo (A); 50 dias de cultivo (B); 60 dias de cultivo (C) e 70 dias de cultivo (D). cal: células alongadas; cal: células arredondadas; cm: células murchas; ei: espaço intercelular.....54

**Figura 10** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase linear: 80 dias de cultivo (A-B); 90 dias de cultivo (C) e 100 dias de cultivo (D); Fase de declínio: 110 dias de cultivo (E); 120 dias de cultivo (F). cal: células alongadas; car: células arredondadas. ....55

**Figura 11** Eletrofotomicrografias de transmissão de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase lag: 20 dias de cultivo (A-C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D) e 60 dias de cultivo (E); Fase linear: 80 dias de cultivo (F) e 100 dias de cultivo (G-I). vp: vacúolo pequeno; ga: grão de amido; pcf: parede celular fina; aei: ausência de espaço intercelular; ei: espaço intercelular; pce: parede celular espessada; v: vesículas; rmp: rompimento da parede celular; cv: célula vacuolada. ....56

**Figura 12** Aspectos histológicos e histoquímicos dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células verdes devido a ação metacromática do azul de toluidina marcando os compostos fenólicos. Fase lag: 20 dias e cultivo (A-C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D) e 60 dias de cultivo (E); Fase linear: 80 dias

de cultivo (F). ctI: células do tipo I; ctII: células do tipo II; ctIII: células do tipo III. ....58

**Figura 13** Aspectos histológicos e histoquímicos de células do tipo I presentes em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células marrons marcando os grãos de amido devido a ação do lugol (A-D). ctI: células do tipo I; ctII: células do tipo II. ....60

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> Número de células viáveis e inviáveis de calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i> durante as fases da cinética de crescimento.....	47
<b>Tabela 2</b> Número de células nas diferentes fases do ciclo celular de calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i> durante as fases da cinética de crescimento .....	50
<b>Tabela 3</b> Testes de histoquímica em calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i> durante as fases da cinética de crescimento .....	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REFERENCIAL TEORICO</b> .....	19
<b>2.1 <i>Byrsonima verbascifolia</i>: aspectos botânicos, taxonomia, fitoquímicos e importância</b> .....	19
<b>2.2 Cultura de calos</b> .....	23
<b>2.3 Viabilidade celular</b> .....	25
<b>2.4 Índice mitótico</b> .....	28
<b>2.5 Morfologia de calos via microscopia eletrônica</b> .....	30
<b>2.6 Análises histoquímicas de calos</b> .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>3.1 Cinética de crescimento dos calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i></b> .....	36
<b>3.2 Viabilidade celular</b> .....	36
<b>3.3 Índice mitótico</b> .....	37
<b>3.4 Análises ultraestruturais</b> .....	38
<b>3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	38
<b>3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	38
<b>3.5 Testes histoquímicos</b> .....	39
<b>3.6 Análises estatísticas</b> .....	40
<b>4 RESULTADOS</b> .....	41
<b>4.1 Cinética de crescimento dos calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i></b> .....	41
<b>4.2 Viabilidade celular</b> .....	44
<b>4.3 Índice mitótico</b> .....	48
<b>4.4 Análises ultraestruturais</b> .....	51
<b>4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	51
<b>4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	56
<b>4.5 Análise histoquímica</b> .....	57

<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>5.1 Cinética de crescimento dos calos de <i>Byrsonima verbascifolia</i></b> .....	61
<b>5.2 Viabilidade celular</b> .....	64
<b>5.3 Índice mitótico</b> .....	66
<b>5.4 Análises ultraestruturais</b> .....	68
<b>5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	68
<b>5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	69
<b>5.5 Análises histoquímicas</b> .....	71
<b>5.6 Análise integrada da viabilidade celular, índice mitótico, ultraestrutura e teste de histoquímica</b> .....	73
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	75
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o bioma com a maior biodiversidade vegetal do mundo, abrangendo os Estados do Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, e Bahia, representando cerca de 20 a 25% do território brasileiro, com destaque para as atividades pecuária e agrícola, o que o torna a região mais ameaçada do Brasil, podendo ocasionar a extinção de muitas espécies de interesse, botânico, ecológico e farmacêutico (VIEIRA; MARTINS, 2000; ARAÚJO et al., 2010).

*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (murici-cascudo) é uma espécie com potencial medicinal encontrada no Cerrado, pertence à família Malpighiaceae e é utilizada pela população local para o tratamento de muitas doenças como diarreia, febre, infecções na mucosa e doença de Chagas, apresenta propriedades cicatrizante, anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica e anti-inflamatória (PINTO; BERTOLUCCI, 2002; GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). A planta possui compostos voláteis nos frutos, glicolipídeos, triterpenos e ácidos triterpênicos nas folhas e proantocianidinas e taninos no tronco (FIGUEIREDO et al., 2005).

*B. verbascifolia* apresenta baixo crescimento vegetativo devido à presença de pirênio e de um tegumento extremamente lignificado funcionando como uma barreira mecânica sobre o embrião impedindo tanto a entrada de água e/ou oxigênio quanto à protusão radicular. Portanto, a propagação sexuada e a produção de mudas, por meios convencionais são inviáveis (NOGUEIRA et al., 2007; SILVA, 2012b).

O cultivo *in vitro* é uma técnica alternativa utilizada para espécies com dificuldades de propagação, possibilitando a produção de mudas de boa qualidade em qualquer época do ano (MUTHUSAMY et al., 2014).

Na embriogenese somática células somáticas passam por um processo de desdiferenciação originando uma massa celular denominada calos (SANTOS et al., 2008).

O cultivo de calos, em espécies de interesse medicinal tem sido amplamente utilizado na morfogênese e na regeneração indireta, em estudos de desenvolvimento, diferenciação celular e na exploração de produtos de origem do metabolismo primário e secundário. Essas informações permitem um melhor entendimento nutricional das vias metabólicas e das enzimas envolvidas na síntese dos metabólitos secundários (VASCONCELOS FILHO, 2009).

O conhecimento mais detalhado do desenvolvimento dos calos através do índice mitótico, da viabilidade celular, das análises ultraestruturais e histológicas, ao longo do cultivo *in vitro*, podem gerar informações importantes para a seleção de células com maior capacidade embriogênica, permitindo a determinação do melhor momento para se iniciar uma suspensão celular, de modo a otimizar a produção de metabólitos secundários *in vitro*, oferecendo perspectivas para projetos, que possibilitarão um significativo avanço no conhecimento científico dessa espécie considerando, principalmente, suas potencialidades medicinais.

Há na literatura trabalhos que investigam o crescimento de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), através da análise do índice mitótico, viabilidade celular e análises ultraestrutural, como os de Nogueira et al. (2007), Herrera et al. (2011) e Silva et al. (2012). Entretanto, não foram encontrados relatos de trabalhos semelhantes para *B. verbascifolia*.

Vasconcelos Filho (2009) caracterizou a anatomia e histoquímica das folhas de *B. verbascifolia* cultivadas *in vivo* e *in vitro*, além de induzir a calogênese e analisar a fitoquímica dos calos.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade celular, o índice mitótico, a ultraestrutura e a histoquímica dos calos de *B.*

*verbascifolia* em cada fase da cinética de crescimento, a fim de fornecer informações sobre o momento ideal para iniciar uma suspensão celular e para seleção de células com maior capacidade embriogênica.

## 2 REFERENCIAL TEORICO

### 2.1 *Byrsonima verbascifolia*: aspectos botânicos, taxonomia, fitoquímicos e importância

O Cerrado ocupa uma área de quase dois milhões de km<sup>2</sup> e contém uma alta biodiversidade, apresentando grande número de espécies com potencial econômico com importância no desenvolvimento regional. Entretanto, tem sido pouco valorizado em termos de conservação, sendo considerado como um dos 25 biomas do mundo, com elevada biodiversidade que sofre grande ameaça. Apenas 0,5% da sua área total, está protegida por unidades de conservação de uso restrito e 3,6% protegidos por alguma categoria de unidade de conservação (FELFILI et al., 2002).

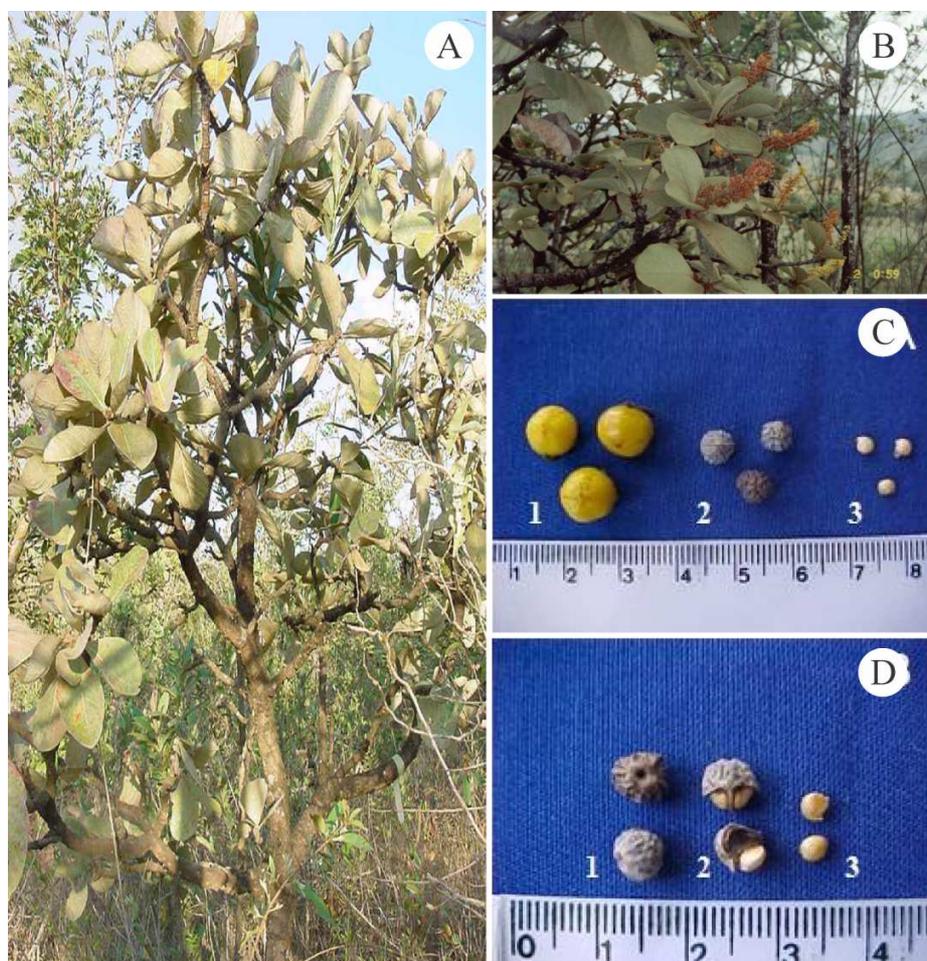
A ocupação desordenada da agricultura no Cerrado, associada à exploração extrativista e predatória, no qual mais de 50% das espécies de plantas medicinais exportadas pelo Brasil são coletadas em seu ambiente natural, colocam espécies utilizadas pela população do Cerrado em risco de extinção. Assim, a exploração indiscriminada dos recursos vegetais pode ocasionar erosão genética, impedindo a regeneração natural de plantas ainda desconhecidas quanto à sua utilização (NASCIMENTO et al., 2011).

Neste bioma encontram-se inúmeras espécies com potencial medicinal e frutífero, com importância extrativista para os habitantes locais. Entre elas está *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae) (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). A família Malpighiaceae abrange aproximadamente 60 gêneros e 1.200 espécies, sendo que no Brasil encontram-se cerca de 50% destas, sendo *Malpighia* e *Byrsonima* os gêneros mais importantes da América. Muitas plantas têm sido empregadas popularmente na região do Cerrado no

tratamento de diversas doenças, como é o caso das espécies pertencentes a este grupo (FIGUEIREDO et al., 2005).

O gênero *Byrsonima* foi descrito pela primeira vez em 1811 e recebeu este nome devido ao fruto formado por dois carpelos. É nativo dos trópicos e subtropicais e possui ampla distribuição na América Central e do Sul, México e Flórida. Há controvérsias quanto ao número de espécies existentes neste gênero, variando entre 100 e 150 espécies. No Brasil, há uma grande variedade de espécies de *Byrsonima* que são popularmente designadas, em suas regiões nativas, pelo nome de murici, sendo diferenciadas pelo local de ocorrência ou pela cor de suas flores e frutos. Desse modo, recebem nomes como murici da várzea, murici-pequeno, murici-cascudo, murici da mata, murici-amarelo, entre outros (ARAÚJO et al., 2010, GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Essas espécies apresentam altos teores de taninos em sua madeira, cascas, folhas e frutos (HERZOG-SOARES et al., 2002).

*Byrsonima verbascifolia*, comumente denominada como murici-cascudo, é uma espécie lenhosa que floresce entre os meses de setembro e novembro e esporadicamente em outras épocas (Figura 1A-B), produzindo cerca de 100 a 500 frutos por planta do tipo drupa, com mesocarpo carnoso e fino; nuculânio constituído de 1 a 3 lóculos, com aproximadamente 6 mm de diâmetro, unido ao endocarpo (Figura 1C-D). Quando maduros, os frutos possuem o epicarpo e a polpa suculenta com uma coloração amarelo intenso, sabor adocicado e cheiro característico (LORENZI, 1998). A escarificação do endocarpo é dificultada pela sua grande rigidez e pela delicadeza das sementes por ele envolvidas (GUSMÃO; VIEIRA; FONSECA, 2006).



**Figura 1** Aspecto geral de *Byrsonima verbascifolia* em área experimental (A); Detalhe das inflorescências (B) Fonte: Castro, 2003; 1. Frutos; 2. Endocarpos esclerificados; 3. Sementes (C); 1. Endocarpo esclerificado; 2. Endocarpo rompido mostrando as sementes no interior; 3. Sementes (D). Fonte: Castro, 2012.

A casca do murici-cascudo é rica em taninos, que são metabólitos secundários fenólicos, de sabor adstringente encontrados no interior dos vacúolos vegetais (CASTRO et al., 2009), são geralmente polifenóis de alta massa molecular e estrutura química variável. Estes compostos apresentam atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarréica,

cicatrizante e anti-inflamatória sendo muito utilizado popularmente como cicatrizante e anti-inflamatório. O chá da casca do caule apresenta atividade que combate a diarreias e disenteria (NOGUEIRA et al., 2008). Nos últimos anos, tem aumentado o interesse na obtenção de drogas a partir de plantas com altos teores de taninos, devido à elevada atividade antioxidante decorrente da inativação dos radicais livres (HERZOG-SOARES et al., 2002, LOPES et al., 2005, FRAZIER et al., 2010).

O murici-cascudo apresenta baixo crescimento vegetativo e emergência lenta da plântula, dificultando a sua propagação sexuada. Na natureza desenvolve-se através de sementes que podem ser prejudicadas por condições ambientais desfavoráveis e/ou por ataques de patógenos e herbívoros (HERRERA et al., 2011).

O estabelecimento de protocolos de micropropagação tem proporcionado o cultivo em larga escala, favorecendo a comercialização das plantas medicinais. Atualmente, a cultura de calos e de suspensões celulares tem propiciado a resolução de alguns problemas relacionados à utilização de plantas para extração de metabólitos secundários, principalmente, os de natureza fenólica, como os taninos, além de permitir a compreensão das vias metabólicas e da atividade de algumas enzimas envolvidas nas rotas de biossíntese dessas substâncias (CASTRO et al., 2009).

Além do uso na medicina popular, os frutos do murici-cascudo são utilizados na alimentação dos moradores do Cerrado e uma importante fonte de renda para suas famílias, devido à comercialização nas feiras livres e mercados públicos da região de ocorrência desta espécie. Os frutos são usados na fabricação de doces, sucos, licores, sorvetes e no consumo *in natura* (GUSMÃO; VIEIRA; FONSECA, 2006, GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

Com flores vistosas, frutos que atraem aves e rápido crescimento, tais espécies têm grande potencial como plantas ornamentais e também são úteis na recuperação de áreas degradadas (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

## 2.2 Cultura de calos

O cultivo *in vitro* é um método de propagação vegetativa utilizado em estudos de diversas espécies vegetais e tem como vantagens a obtenção de diversas plantas a partir de um explante inicial, plantas de boa qualidade durante todo o ano, redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outras técnicas (ERIG; SCHUCH, 2005).

Injúrias, física ou química, provocadas em alguns órgãos das plantas induzem como resposta morfológica uma intensa atividade mitótica, formando um aglomerado de células parcialmente indiferenciadas denominadas calos (TAIZ; ZEIGER, 2004; NOGUEIRA et al., 2007). Este processo recebe o nome de calogênese e expressa a totipotencialidade das células, no qual cada célula vegetal tem potencial genético para originar uma planta inteira, postulado por Haberlandt (1902).

A calogênese é usada para estudar o desenvolvimento e crescimento dos calos, empregada para viabilizar mecanismos de propagação pelas rotas organogênica ou embriogênica. Esse processo necessita da ação de fitorreguladores e/ou reguladores de crescimento para a desdiferenciação celular dos tecidos diferenciados (SANTOS et al., 2013).

Ao serem inoculados, os explantes sofrem um estresse significativo, pois são retirados do seu ambiente original e inseridos em outro ambiente, no qual apresentam a concentração hormonal e nutricional diferente do meio de origem. Quando os níveis de estresse são mais altos que a tolerância celular, o explante

morre. O estresse em baixo nível ativa mecanismos que irão induzir as células as novas condições, e o explante cresce e se desenvolve (TORRES, 2013).

Os fitohormônios são compostos químicos endógenos das plantas envolvidos com o controle da atividade gênica em nível de transcrição e de tradução. Essas substâncias exercem sua atividade através de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos fisiológicos e bioquímicos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), agindo na interação dos processos de competência, indução, determinação e diferenciação celular, formando novos órgãos *in vitro* (morfogênese) (SOARES et al., 2007).

Tanto na indução de calos, quanto na produção de metabolitos secundários *in vitro* utiliza-se combinação de reguladores de crescimento como auxinas e citocininas, que estão relacionados com o aumento da divisão e proliferação celular (SANTOS et al., 2013).

As auxinas e citocininas participam da regulação do ciclo celular dos eucariotos controlando a atividade das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que são enzimas que junto com as ciclinas regulam o ciclo celular (TAIZ; ZEIGER, 2004). As auxinas são responsáveis por iniciar a divisão celular e controlar o crescimento e alongação celular. As citocininas além de estimular a divisão celular, reduz a dominância apical e induz a formação de brotos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

O mecanismo de ação das auxinas está relacionado com a formação de um complexo receptor proteico-hormônio no citoplasma, que migra até o núcleo da célula promovendo ativação da RNA-polimerase, aumentando a transcrição de genes envolvidos na regulação da divisão celular (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A adição de reguladores de crescimento em culturas vegetais *in vitro* visa suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de fitohormônios nos

explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-mãe, além de direcionar uma resposta morfogênica desejável (RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009).

Os calos podem apresentar consistência compacta ou friável e variam quanto a cor, ao tamanho, tipo, conteúdo celular e à espessura da parede. O grau de diferenciação celular e o potencial embriogênico dependem do meio de cultura utilizado, do explante de origem e do requerimento de regulador de crescimento (tipo, concentração e razão auxina/citocinina). O balanço entre auxina e citocinina controla diversos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Para uma melhor compreensão do desenvolvimento dos calos é importante se estabelecer a cinética de crescimento dos calos, que geralmente compreende seis fases distintas: *lag* (produção de energia e síntese de proteína), exponencial (intensa divisão celular), linear (aumento de volume celular), desaceleração (redução na divisão celular), estacionária (não há divisão celular) e a fase de declínio (lise celular) e normalmente apresenta comportamento sigmoide, sendo a fase estacionária representada pelo platô final. Na fase estacionária o crescimento se estabiliza, pois as células não estão em divisão celular, sendo necessário um novo estímulo para continuar a desenvolver, sendo necessário a transferência dos calos para um novo meio (SANTOS et al., 2013; FEITOSA et al., 2013).

### **2.3 Viabilidade celular**

A viabilidade celular pode ser determinada pela porcentagem de células vivas e mortas, com base numa amostra celular total. Os testes de viabilidade celular podem ser usados para avaliar a eficácia de um pesticida ou inseticida,

avaliar danos ambientais sobre o organismo, testar o efeito de determinadas substâncias sobre o desenvolvimento celular e a proliferação adequada de células cultivadas *in vitro* (SILVA et al., 2001; ROGERO et al., 2003). Alterações cromossômicas detectadas em plantas cultivadas *in vitro* colaboram para a redução da viabilidade das células representando uma possível causa para o declínio do desenvolvimento (FRANCHI et al., 2012).

Para avaliar a viabilidade celular utiliza-se como parâmetros a integridade da membrana, atividade enzimática, teor de ácido nucléico e o potencial de membrana. Em geral, quando dois ou mais testes são utilizados simultaneamente, deseja-se combinar um teste que é positivo para um determinado parâmetro (como a atividade enzimática) com um que é negativo para outro (por exemplo, a integridade da membrana plasmática). Deste modo, as células viáveis ou vitais são claramente discernidas por desenvolvimento de fluorescência a partir de um determinado teste, o que também gera uma maior confiança na interpretação dos resultados devido à utilização de mais de um teste (HERNLEM; HUA, 2010). Métodos duplos de coloração para avaliar a viabilidade das células envolvem a pigmentação distinta das células mortas e vivas, permitindo a diferenciação das mesmas (KANESHIRO; WYDER; WU, 1993).

As medições da viabilidade celular podem ser importantes para caracterizar as populações celulares, especialmente aquelas que exibem morte celular espontânea, ou ocasionada por agentes ativos da membrana, embora estas medições não estimem as células atividade reprodutivas (FRANKFURT, 1983). Células com maior potencial embriogênico apresentam características semelhantes às células meristemáticas, como tamanho pequeno, forma isodiamétrica e citoplasma denso. Essas informações podem ser obtidas a partir da utilização de corantes para determinar a viabilidade celular (FILONOVA et al.; 2000; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003).

O corante azul de tripano é o mais comumente usado para determinar a viabilidade celular, porém a utilidade deste procedimento é limitada uma vez que o número de células coradas de azul aumenta quando expostas ao corante por mais de 5 minutos, produzindo resultados imprecisos. Além disso, pode ser excluído de ambas as células, metabolicamente viáveis e não viáveis, quando utilizados em meios de cultura contendo proteínas do soro, pois forma um complexo com a albumina. Este fato sugere que os corantes fluorescentes são indicadores mais precisos e confiáveis para a determinação da viabilidade celular, pois a captação segue estável e permite que sejam determinados vários dias após a aplicação (ALTMAN; RANDERS; RAO, 1993).

Os corantes tais como diacetato de fluoresceína (FDA) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) são capazes de difundir-se através da superfície da membrana celular, devido as suas propriedades hidrofóbicas. Uma vez no meio intracelular, os compostos são clivados por enzimas, esterases, perdendo moléculas de acetato, resultando em produtos verdes fluorescentes que são hidrofílicos, impedindo a sua difusão para fora da célula. Os produtos, fluoresceína e carboxifluoresceína, compostos verdes fluorescentes, apresentam relativamente uma baixa intensidade de fluorescência e rapidamente por exposição à luz ocorre à perda da mesma. O extravasamento dos corantes das células também podem causar problemas durante a análise de viabilidade, no entanto, adição de substâncias tais como a hemoglobina pode ser usada para impedir o vazamento fluorescência. As esterases têm sido muito utilizadas para ensaios de viabilidade, bem como para a quantificação da proliferação celular (DANKBERG; PERSIDSKY, 1976, ALTMAN; RANDERS; RAO, 1993, KANESHIRO; WYDER; WU, 1993). Apenas células vivas convertem o FDA em fluoresceína, tendo como vantagem a velocidade de obtenção dos resultados (SILVA et al., 2012a).

Compostos como o brometo de etídio (BE) e iodeto de propídio (PI), podem entrar nas células mortas através das superfícies danificadas das membranas plasmáticas, no qual a célula não tem a sua estrutura interna protegida, encontrando-se exposta ao meio ambiente, além de não conseguir manter ou gerar gradiente eletroquímica, responsável pelo potencial de membrana. O iodeto de propídio se liga as cadeias de DNA, corando-o de vermelho ou amarelo, que vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade de membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente (KANESHIRO; WYDER; WU, 1993; SILVA et al., 2001).

O método de dupla coloração utilizando o FDA-PI para determinar a viabilidade celular é rápido, confiável, preciso e conveniente. As células podem ser contadas após 5 minutos da adição dos corantes, no qual marca as células viáveis de verde e células inviáveis de vermelho. As lâminas podem ser montadas até uma semana depois do preparo da suspensão celular sem perda das suas características e podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência (JONES; SENFT, 1985).

#### **2.4 Índice mitótico**

O ciclo celular das células somáticas está dividido na interfase e na divisão celular ou mitose, sendo a primeira constituída pelas fases G1 (crescimento celular), S (duplicação dos cromossomos) e G2 (preparo para a divisão celular). Neste período ocorrem diversas modificações, molecular, bioquímica e estrutural, no núcleo celular. A mitose produz duas células filhas, com o mesmo número de cromossomos da célula mãe, composta pelas fases de prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, que é habitualmente seguida pela citocinese (separação das células filhas). O ciclo celular tem duração

variada de acordo com o organismo e célula observados (ALBERTS et al., 2008).

O índice mitótico (IM) corresponde à relação do número de células em mitose e número total de células, sendo representado pela fórmula “ $IM = N^{\circ} cm / N^{\circ} ct$ ”, no qual  $N^{\circ} cm$  representa o número de células em divisão mitótica (prófase + metáfase + anáfase + telófase) e  $N^{\circ} ct$  o número de células totais (intérfase + mitose), multiplicando-se por 100 (PIRES et al., 2001), sendo considerada como a capacidade da população celular de crescer (HAO et al., 2002).

O índice mitótico pode ser usado como indicador de proliferação adequada das células, aplicados em estudos de toxicidade e mutagenicidade (GADANO et al., 2002; ROGERO et al., 2003), no qual a citotoxicidade de determinadas substâncias pode ser obtida pela diminuição ou aumento do índice mitótico (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A frequência da divisão celular é um importante parâmetro para avaliar o crescimento de células cultivadas *in vitro*, que devem apresentar elevada capacidade de regeneração mesmo após longos períodos de cultivo e também possibilita identificar diversas anormalidades mitóticas associadas com a idade das culturas (FRANCHI et al., 2012).

Células em divisão ocorrem nos tecidos em crescimento, como é observado nos meristemas apicais, tais como os das raízes primárias. Estes tecidos apresentam maior ou menor suscetibilidade a diversos estresses abióticos ou bióticos, indicando tanto a toxicidade de uma determinada substância, quanto o nível de reação em função de um determinado genótipo (MOLINA et al., 2006).

O aumento da divisão celular pode ser prejudicial às células por ocasionar proliferação celular desordenada e até mesmo a formação de tecidos tumorais, e geralmente são observados índices mitóticos maiores que o controle.

A diminuição significativa da mitose é devido a ação de substâncias tóxicas que agem sobre o desenvolvimento e crescimento do organismo exposto, que pode ser provocada pelo bloqueio da Fase G2 do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose ou inibição da síntese do DNA, havendo redução do índice mitótico em relação ao controle (TURKOGLU, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A partir da determinação da cinética de crescimento de calos, que é constituída pelas fases *lag*, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e de declínio, pode-se determinar o índice mitótico para cada fase desta curva, tornando possível conhecer o intervalo médio dos subcultivos (STEIN et al., 2010) e também estabelecer o momento exato da utilização dos calos em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (NOGUEIRA et al., 2008 ).

## **2.5 Morfologia de calos via microscopia eletrônica**

A microscopia eletrônica utiliza elétrons como fonte de iluminação da amostra, possibilitando ganhos em termos de aumento e resolução do espécime em questão. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) os elétrons são utilizados para varrer as amostras gerando elétrons secundários ou retroespalhados que podem ser capturados e gerar a imagem. Na microscopia eletrônica de transmissão (MET) um feixe de elétrons é direcionado para a amostra e a atravessa em maior ou menor intensidade, gerando imagens através de elétrons transmitidos. As imagens obtidas são tridimensionais, de fácil interpretação, de grande utilidade para avaliar a estrutura superficial e interna de uma dada amostra (ALVES, 2004).

A morfologia vegetal consiste no estudo da forma e do desenvolvimento das plantas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001) podendo ser interpretada de

acordo com o formato das estruturas e tecidos, e está relacionada com a fisiologia vegetal. Diversas respostas morfogenéticas são observadas no cultivo *in vitro* e estão ligadas ao balanço hormonal do meio de cultura. Dessa forma, os reguladores de crescimento podem influenciar a morfologia vegetal (TREVIZAM et al., 2011).

A padronização da coloração e da morfologia externa pode ser dificultada pelas características dos calos que pode ser específica da espécie, sendo necessárias análises anatômicas e ultraestruturais (PÁDUA et al., 2013).

Calos com potencial embriogênicos são formados por células meristemáticas, caracterizadas pelo formato isodiamétrico, tamanho reduzido, núcleo grande com nucléolo proeminente, mitocôndrias de formato arredondado, citoplasma com pouco espaço intercelular e sistema celular organizado (NOGUEIRA et al., 2007; PÁDUA et al., 2013).

Durante a calogênese é possível determinar características embriogênicas, no qual fornecem informações importantes sobre as condições ideais para obter calos e suspensões celulares embriogênicas, permitindo adequar protocolos que viabilizem a transformação genética por meio da embriogênese somática indireta, reduzindo o custo de produção, tempo e mão-de obra (HERRERA et al., 2011).

As análises ultraestruturais, através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão, permitem observar detalhes da morfologia interna e externa dos tecidos, avaliar o potencial embriogênico dos calos, distinguindo calos embriogênicos dos não embriogênicos, avaliar a atividade de organelas e as alterações celulares, além de compreender o desenvolvimento celular o que possibilita caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente embriogênicas (NOGUEIRA et al., 2007).

As análises ultraestruturais permitem observar as mudanças que ocorrem nas distintas fases do crescimento e desenvolvimento dos calos, fornecendo

dados relacionados aos processos morfogênicos *in vitro* dos vegetais. Com estes estudos também é possível identificar fatores que desencadeiam as mudanças fisiológicas nos explantes, como o desenvolvimento do embrião somático ou a aquisição de friabilidade (VASCONCELOS et al., 2012).

O embrião somático segue uma sequência de desenvolvimento, passando pelos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, num processo ontogenético, com a formação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. As plantas desenvolvidas *in vitro* podem apresentar a anatomia, a fisiologia e a morfologia externa anormais, devido à alta umidade relativa, baixa irradiância, altas concentrações do dióxido de carbono, interferindo na fotossíntese, e elevadas concentrações de sais e de carboidratos, que são utilizados para fornecer carbono e energia (PÁDUA et al., 2013).

## **2.6 Análises histoquímicas de calos**

Segundo Pádua et al. (2013), as análises histoquímicas são de grande valia no estudo de calos, pois permitem visualizar características embriogênicas das células e fornecem informações mais detalhadas sobre a organização e distribuição dos compostos nos tecidos. Possibilitam também, a identificação de substâncias produzidas pelas plantas, derivadas tanto do metabolismo primário, quanto do metabolismo secundário, e auxiliam na identificação da natureza e local de ocorrência nas plantas (CORTE et al., 2009).

De acordo com Feitosa et al. (2013), os testes histológicos também podem ser utilizados para caracterizar os processos e as vias de regeneração das plantas *in vitro*.

Diversos trabalhos como os de Michaux-Ferrera Dublin e Schwendiman (1987), Michaux-Ferrera et al. (1989); Berthouly e Michaux-Ferrera, (1996) e Bieysse, Gofflot e Michaux-Ferrera (1993), relataram que o início da divisão

celular dos explantes ocorre nas células que são menos diferenciadas, por indução dos reguladores de crescimento.

As células não embriogênicas são originadas das células menos diferenciadas que se dividem em uma única direção e se diferenciam em células parenquimáticas com grande vacúolo, essas não apresentam substâncias de reserva, como amido e proteínas. As células embriogênicas dividem-se em diversos planos e origina células menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína. Estas características sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA. Desta forma, os testes de histoquímica podem ser utilizados para selecionar calos embriogênicos e não-embriogênicos, devido a estas características estruturais marcadoras (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; SANTOS, 2002).

O desenvolvimento do embrião prossegue devido à atividade dos meristemas radicular e caulinar, formando os tecidos meristemáticos primários: protoderme, meristema fundamental e procâmbio (APEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). A visualização destes tecidos permite identificar a formação normal dos embriões e a fase de desenvolvimento (PADUA et al., 2013). O azul de toluidina reage com os núcleos e membranas celulares, corando de azul e violeta, permitindo a distinção dos tecidos (TORRES, 2013).

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam alterações estruturais em relação às plantas *in vivo*, como a cutícula delgada, parede celular das células da epiderme abaxial acentuadamente sinuosa e células da epiderme abaxial retangulares (VASCONCELOS FILHO, 2009).

O amido é um polissacarídeo e principal açúcar de reserva dos vegetais, em células embriogênicas, é utilizado para fornecer energia para a atividade

mitótica e, posteriormente, para o desenvolvimento dos embriões (NOGUEIRA et al., 2008).

Na literatura há diversos trabalhos, como Maheswaran e Williams (1986); Profumo, Gastaldo e Rascio (1987); McCleary e Matheson (1976), mostrando que grande quantidade de grãos de amido está relacionada com a aquisição de potencial embriogênicos.

Os metabólitos secundários são substâncias de defesa das plantas, sendo expresso de forma quantitativa e qualitativamente diferente de órgão para órgão e de espécie para espécie (TAIZ; ZEIGER, 2004). E seus níveis são determinados por influência ambiental e controle genético (CASTRO et al., 2009).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários quimicamente heterogêneos, incluem uma grande diversidade de compostos, como os flavonoides, os taninos e os ácidos benzoicos e cinâmicos. Os idioblastos e as células epiteliais que delimitam cavidades são estruturas envolvidas na secreção destas substâncias, que estão presentes em quase todos os vegetais nos vacúolos, citoplasma ou impregnados a parede celular. Em órgãos completamente diferenciados a presença dos compostos fenólicos estão relacionados com os mecanismos de defesa da planta, como proteção contra a herbívoros, ataque de patógenos e microrganismos, dessecação, entre outros (APEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Os taninos são substâncias polifenólicas que apresentam atividade antioxidante decorrente da inativação de radicais livres. A síntese dos taninos está relacionada aos processos de crescimento e diferenciação celular e a degradação destas substâncias favorece a divisão celular evitando a oxidação do material vegetal. São biossintetizados diretamente do metabolismo do carbono e armazenados nos vacúolos das plantas (CASTRO et al., 2005, CASTRO et al., 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido entre julho de 2012 a dezembro de 2013, nos Laboratórios de Citogenética Vegetal (Departamento de Biologia), Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal), Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (Departamento de Fitopatologia) e no Laboratório de Histologia e Anatomia Vegetal (Departamento de Biologia), da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A espécie estudada foi o murici-cascudo (*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. Malpighiaceae), cujos frutos foram coletados nos meses de janeiro a março de 2012, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, situado ao sul do Estado de Minas Gerais, a 832 m de altitude, 21°11'36,97"S de latitude e longitude 44°55'59,07W GRW. A coleta foi registrada junto ao SISBIO sob no 24542-2, em 20/09/2011, Registro no IBAMA: 5042260. Amostras do material vegetal foram coletadas e herborizadas. As exsiccatas foram identificadas pela Dra. Andréia Fonseca Silva, curadora do Herbário PAMG (fiel depositário), pertencente à Empresa Mineira de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG), sediada em Belo Horizonte/MG e depositadas sob o registro PAMG 56309. Os segmentos foliares empregados como fonte de explante para a calogênese foram induzidos no Laboratório de Farmacobotânica e Plantas Medicinais da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus* Centro-Oeste D. Lindu, em Divinópolis (MG), a partir da germinação de embriões *in vitro*, no qual foram inoculados em meio contendo sais minerais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0, 15, 30, 45 e 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após inoculação, os embriões foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 25 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 3.1 Cinética de crescimento dos calos de *Byrsonima verbascifolia*

Os calos foram induzidos a partir de explantes foliares obtidos de plântulas com 40 dias de idade, provenientes de embriões germinados *in vitro*, segundo metodologia descrita por Castro et al. (2005).

Segmentos foliares de aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup> de área foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e acrescidos de 4,52µM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 4,44µM de BAP (6-benzilaminopurina). Os calos foram cultivados na ausência de luz.

A curva de crescimento dos calos foi obtida a partir de pesagens do material inoculado fresco, a partir do 10º dia da inoculação, até ser atingida a fase de declínio, em intervalos de 10 dias, por um período de 120 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e cada pesagem composta por 12 repetições, constituída por 12 tubos, cada tubo contendo um explante.

Amostras de calos frescos, obtidas ao longo da curva de crescimento foram monitoradas através das análises da viabilidade celular, índice mitótico, análises ultraestruturais e teste de histoquímica.

### 3.2 Viabilidade celular

Amostras de calos, com aproximadamente 0,4 g de matéria fresca foram homogeneizadas em 4mL de solução de manitol 0,6M e CaCl<sub>2</sub> 0,03M, por 15 minutos, a 6000 rpm, em temperatura de 27±2°C. Na ausência de luz, essas amostras foram filtradas em peneiras com malha de 200µm, retirando-se 940µL da suspensão e adicionando-se 40µL de uma solução de diacetato de fluoresceína (FDA) e 20µL de iodeto de propídio (IP) em microtubo. Após 5

minutos, procedeu-se a contagem de células viáveis com fluorescência verde e células inviáveis com fluorescência vermelha, em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, utilizando-se os filtros nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 460/510 para FDA e 530/615 para IP sob aumento total de 100X. A viabilidade celular foi obtida para cerca de 680 células.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por período de coleta.

### **3.3 Índice mitótico**

Amostras de calos frescos, de aproximadamente 0,1g foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (etanol:ácido acético glacial - 3:1), por 20 horas, à temperatura ambiente e, após, foram armazenadas em freezer, para posterior análise citológica. Para determinação do índice mitótico, frações de calos, depois de lavadas com água destilada, foram transferidas para microtubos contendo 1,0mL de tampão McIlvaine (pH 7,0) e, em seguida filtradas em peneira com malha de 200 $\mu$ m e centrifugadas a 6.000 rpm, por 4 minutos. 20 $\mu$ L da suspensão celular será depositada em uma lâmina, com 20 $\mu$ L de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), na concentração de 2 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Após 5 minutos foi realizada observação em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, utilizando-se filtro WU sob aumento total de 400X. O índice mitótico [(número de células em mitose/número total de células) x 100] foi obtido para cerca de 1100 células (HERRERA et al., 2011).

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por período de coleta.

### **3.4 Análises ultraestruturais**

#### **3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Para observação da superfície dos calos, as amostras foram fixadas em solução Karnovsky, até o momento das análises. Para os estudos, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato a 0,05M (3 vezes - 10 minutos cada) e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, durante 4 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram desidratadas em acetona em uma série progressiva (25%, 50%, 75%, 90% e 100% - 3 vezes por 10 minutos), submetidas ao ponto crítico de dessecação de CO<sub>2</sub> em equipamento BAL-TEC, CPD-030, fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro metálico (10 nm) em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material foliar preparado foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP.

#### **3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

Para detalhamento de estruturas internas, amostras de calos foram fixadas em solução Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5%) em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,0), durante 24 horas, em geladeira.

Posteriormente, as amostras foram lavados 3 vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1%, por 4 horas. Em seguida os fragmentos foram colocados em acetato de uranila a 4°C por no mínimo 8 horas. Então foram lavadas em água destilada e submetidas a desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) e em 100%, por 10 minutos, 3 vezes. A seguir foram realizada inclusão em resina (resina: acetona - 1:3, 1:2, 1:1, 2:1) por no mínimo 8 horas em cada. Em seguida

as amostras foram transferidas para resina 100%, por 24 horas, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para polimerização em estufa a 70°C, por 48 horas. Os blocos foram aparados em forma de trapézio com auxílio de lâmina. Em sequência, as amostras foram cortadas em ultra micrótomo e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação e o registro dos dados foram realizados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109.

Os calos foram selecionados para as análises de microscopia eletrônica de transmissão de acordo com os resultados das análises da viabilidade celular e índice mitótico.

### **3.5 Testes histoquímicos**

Os calos fixados em Karnovsky foram lavados em tampão cacodilato a 0,05M (3 vezes - 10 minutos cada). A desidratação foi realizada em série etílica (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%) por 15 minutos em cada. Em seguida, os calos foram transferidos consecutivamente para álcool comercial, álcool 100% e para quantidades iguais de resina com álcool 100%, por 2h em cada. Posteriormente os calos foram infiltrados em resina pura durante 24h e emblocados em historesina Leica de acordo com o protocolo do fabricante (15:1 resina: polimerizador). Os cortes, com espessura de 5 µm, foram obtidos em micrótomo rotativo semiautomático Yidi.

Após o emblocamento, foram realizados testes histoquímicos com azul de toluidina, visualização dos tecidos e compostos fenólicos (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e lugol, para identificação de amido (JOHANSEN, 1940). Os testes foram realizados em cada período de coleta. As observações foram feitas em microscópio Olympus CX 31 empregando-se aumento de 4x e 10x e a captura das imagens foi realizada pelo programa BEL View.

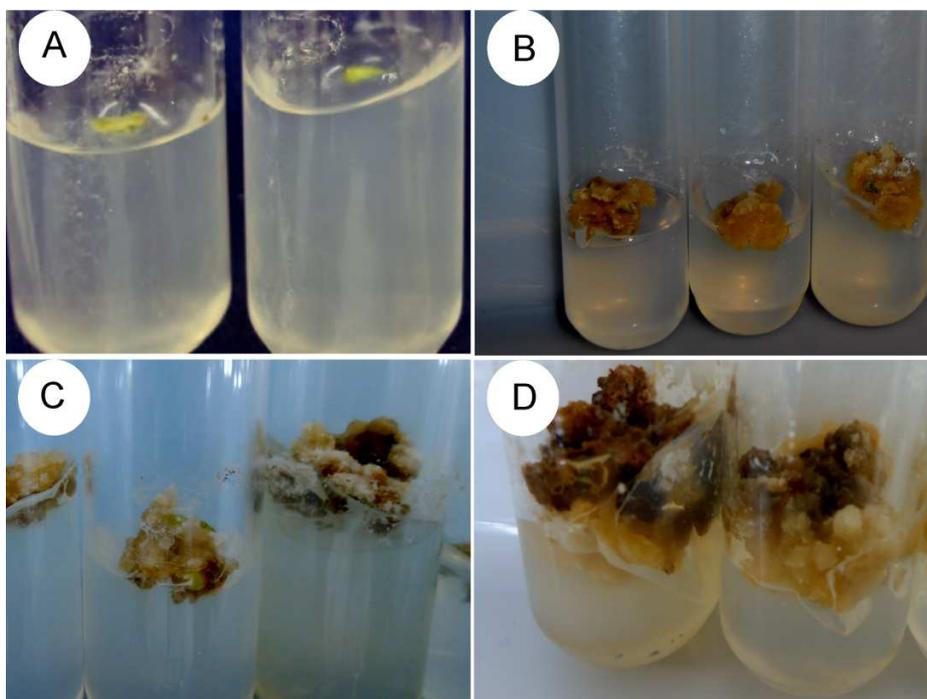
### **3.6 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (FERREIRA, 2011). Com o objetivo de verificar diferenças estatísticas entre os dias de cultivo e entre as fases observadas durante o crescimento dos calos, as médias obtidas em relação à porcentagem de células viáveis foram submetidas ao teste de Scott e Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cinética de crescimento dos calos de *Byrsonima verbascifolia*

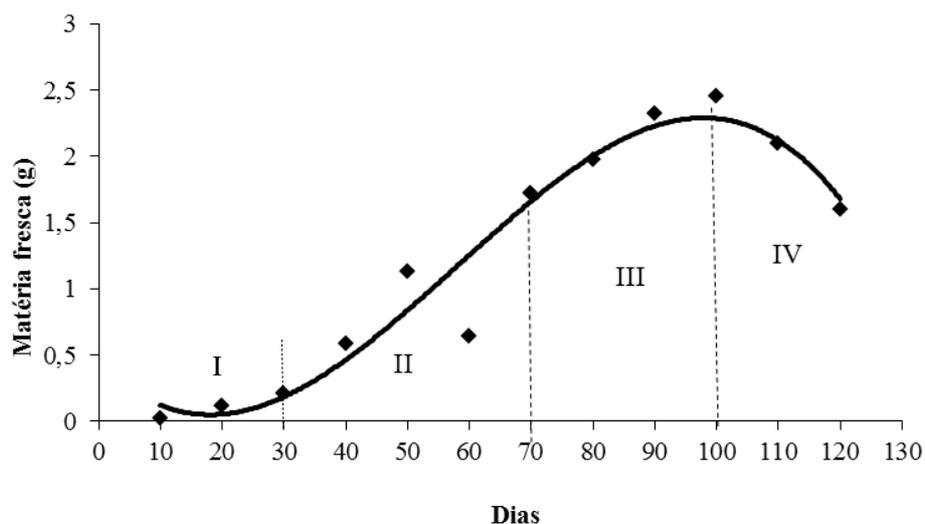
Durante a avaliação do crescimento, foram observados calos com consistência friável e com três colorações distintas: amarelo, preto e branco (Figura 2).



**Figura 2** Explante (A) e Aspecto geral dos calos (B-D) dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Explante inicial (A); Calos com coloração amarela (B); Calos com coloração branca (C); Calos com coloração preta (D).

Os calos apresentaram um crescimento com padrão sigmoidal, com quatro fases distintas: *lag*, exponencial, linear e declínio, representada pela

equação de regressão  $y = -9E-06x^3 + 0,0015x^2 - 0,0466x + 0,443$  ( $R^2 = 0,9391$ ) (figura 3).



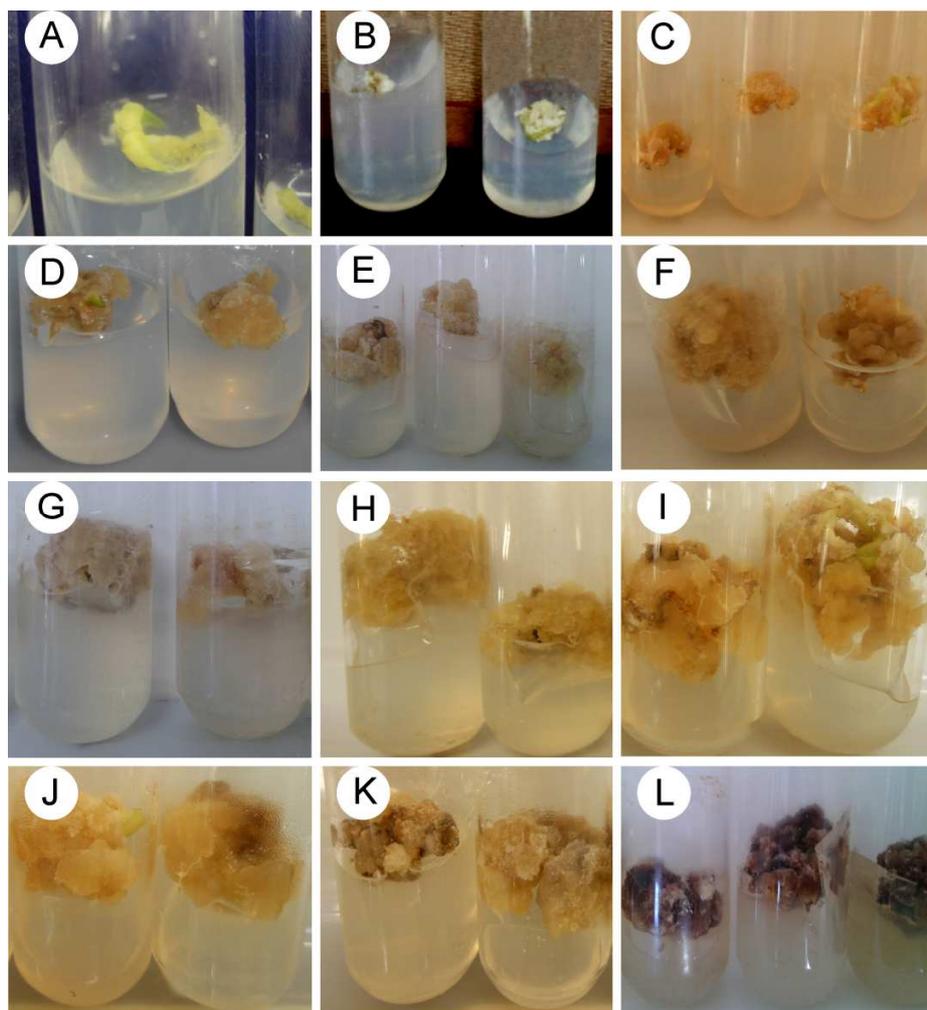
**Figura 3** Cinética de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. I- fase lag (0-30 dias), II- fase exponencial (31-70 dias), III- fase linear (71-100), IV- fase de declínio (101-120 dias).

A análise de regressão mostrou que o 2,4-D associado ao BAP induziram calos com maior acúmulo de matéria fresca até o 100º dia.

As matérias fresca e seca foram parâmetros utilizados para monitorar o crescimento dos calos (Figura 3). A massa fresca aumentou ao longo de todo o cultivo, com exceção dos 60 dias, em que se observou um decréscimo, seguido do restabelecimento do crescimento. A matéria seca se comportou de maneira semelhante à matéria fresca, acumulando ao longo do cultivo e decrescendo após 100 dias de cultivo.

A fase lag ocorreu até o 30º dia após a inoculação e caracterizou-se pelo acúmulo de matéria fresca, com média de 0,12g. Nesta fase, os calos

apresentaram coloração verde nos primeiros períodos de cultivo, até o 20º dia (Figura 4A-B) e cor amarela aos 30 dias de cultivo (Figura 4C).



**Figura 4** Aspecto geral dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Fase lag: 10 dias de cultivo (A), 20 dias de cultivo (B) e 30 dias de cultivo (C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D), 50 dias de cultivo (E), 60 dias de cultivo (F) e 70 dias de cultivo (G); Fase linear: 80 dias de cultivo (H), 90 dias de cultivo (I) e 100 dias de cultivo (J); Fase de declínio: 110 dias de cultivo (K) e 120 dias de cultivo (L).

A fase exponencial estendeu-se do 31° ao 70° dias, havendo um declínio do crescimento entre o 50° ao 60° dia de cultivo, seguido de uma intensa divisão celular entre 60° ao 70° dias. Nessa fase, obteve-se média de 1,02g de matéria fresca e crescimento de 88% em relação à fase anterior. Os calos apresentaram coloração amarelada e consistência friável (Figura 4D-G). A partir dos 60 dias de cultivo alguns calos apresentaram os primeiros sinais de oxidação.

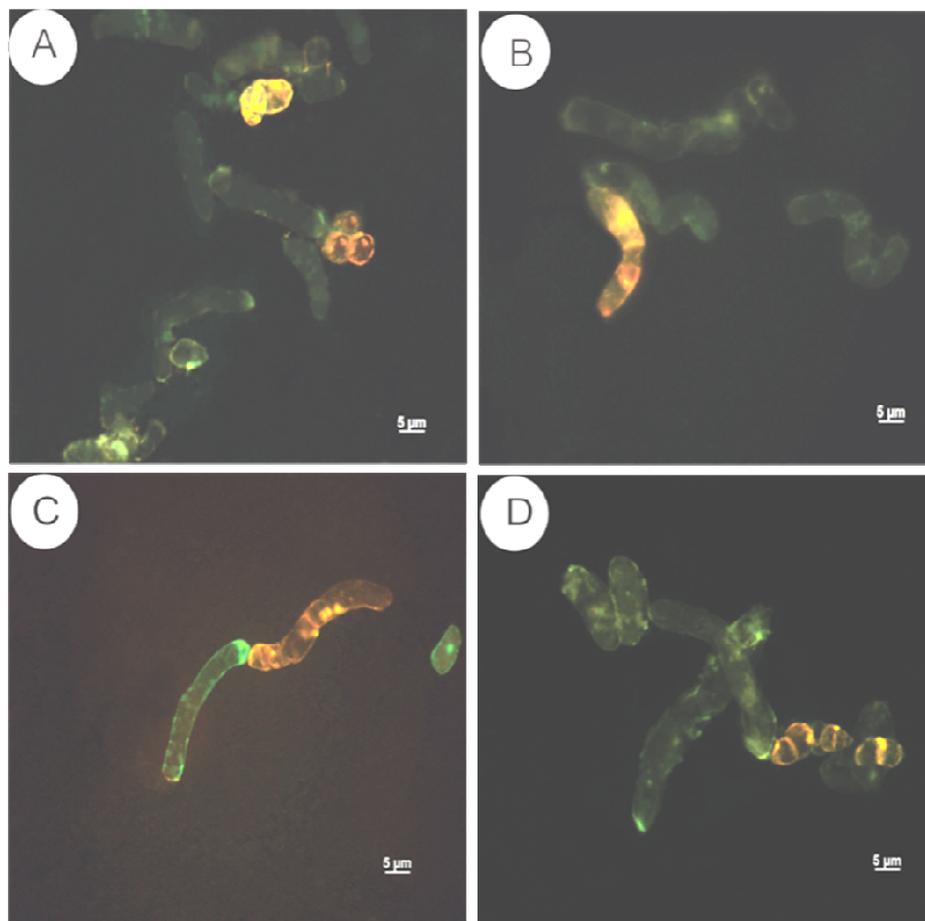
A fase linear foi observada entre o 71° e o 100° dia de cultivo, com acúmulo de matéria fresca de 95% superior em relação à fase *lag* e média de 2,23g de matéria fresca. Os calos desta fase são friáveis e amarelos, porém alguns apresentaram sinais de oxidação (Figura 4H-J).

As fases estacionária e de desaceleração não foram observada em *B. verbascifolia*.

A partir do 101° dia, a cultura entrou na fase de declínio, a qual é caracterizada por uma redução de 20% nos valores de matéria fresca, em relação à fase exponencial, com média de 1,853g. Nesta fase, os calos apresentaram consistência friável e coloração amarelada com grandes regiões oxidadas (Figura 4K). No final do período experimental, os calos estavam completamente oxidados (Figura 4L).

## 4.2 Viabilidade celular

Utilizando a dupla-coloração com FDA-IP foram observadas 7540 células, as quais foram identificadas como vivas pela fluorescência verde e mortas pela fluorescência vermelha, em todas as fases de crescimento dos calos de *B. verbascifolia* (Figura 5).



**Figura 5** Viabilidade celular em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células viáveis com fluorescência verde e células inviáveis com fluorescência vermelha (A-D).

Para o período de 10 dias não foi realizado o teste de viabilidade celular devido à baixa taxa de crescimento vegetativo, não havendo material suficiente para determinar a porcentagem de células viáveis.

Na Tabela 1 pode-se observar que a comparação entre as diferentes fases observadas durante a calogênese mostrou que durante as fases *lag*, exponencial e

linear os calos apresentavam células com maior viabilidade e que essa reduziu significativamente na fase de declínio ( $p < 0,05$ ).

As fases *lag*, exponencial, linear e declínio apresentaram médias de 83%, 83%, 74% e 48% de células viáveis, respectivamente (Tabela 1).

Entretanto, quando se comparou a porcentagem de células viáveis entre os dias de cultivo, verificou-se que, os calos de *B. verbascifolia* apresentaram uma maior viabilidade celular aos 20 e 40 dias de crescimento ( $p < 0,05$ ) e, posteriormente, aos 30 e 90 dias ( $p < 0,05$ ). Entre os períodos de 50 a 70 dias da fase exponencial, 80 a 100 dias da fase linear e 110 dias da fase de declínio, houve uma redução na viabilidade celular, mas que não diferiu estatisticamente entre eles. ( $p > 0,05$ ). Uma menor porcentagem de células viáveis foi observada no final da fase de declínio, aos 120 dias de cultivo, estatisticamente diferente de todos os demais dias de cultivo.

**Tabela 1** Número de células viáveis e inviáveis de calos de *Byrsonima verbascifolia* durante as fases da cinética de crescimento

Fases da Cinética de crescimento	Período de cultivo	Total de células	Células Vivas (%)	Células Mortas (%)	Total de células	Células Vivas (%)	Células Mortas (%)
<i>Lag</i>	20 dias	865	85a*	15	1585	84	16
	30 dias	720	81b	19			
			—				
			$\bar{x}$ 83 A				
<b>Exponencial</b>	40 dias	977	84 a	16	2818	73	17
	50 dias	660	68 c	32			
	60 dias	609	68 c	32			
	70 dias	572	68 c	32			
			—				
			$\bar{x}$ 83 A				
<b>Linear</b>	80 dias	596	78 c	22	1935	77	13
	90 dias	676	80 b	20			
	100 dias	663	74 c	26			
			—				
			$\bar{x}$ 74 A				
<b>Declínio</b>	110 dias	541	63 c	37	1202	49	51
	120 dias	661	32 d	68			
			—				
			$\bar{x}$ 48 B				
<b>Total</b>		7540			7540		

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula correspondem à comparação entre os dias de cultivo e não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Teste Scott-Knott. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula correspondem à comparação entre as diferentes fases de crescimento e não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Teste Scott-Knott

### 4.3 Índice mitótico

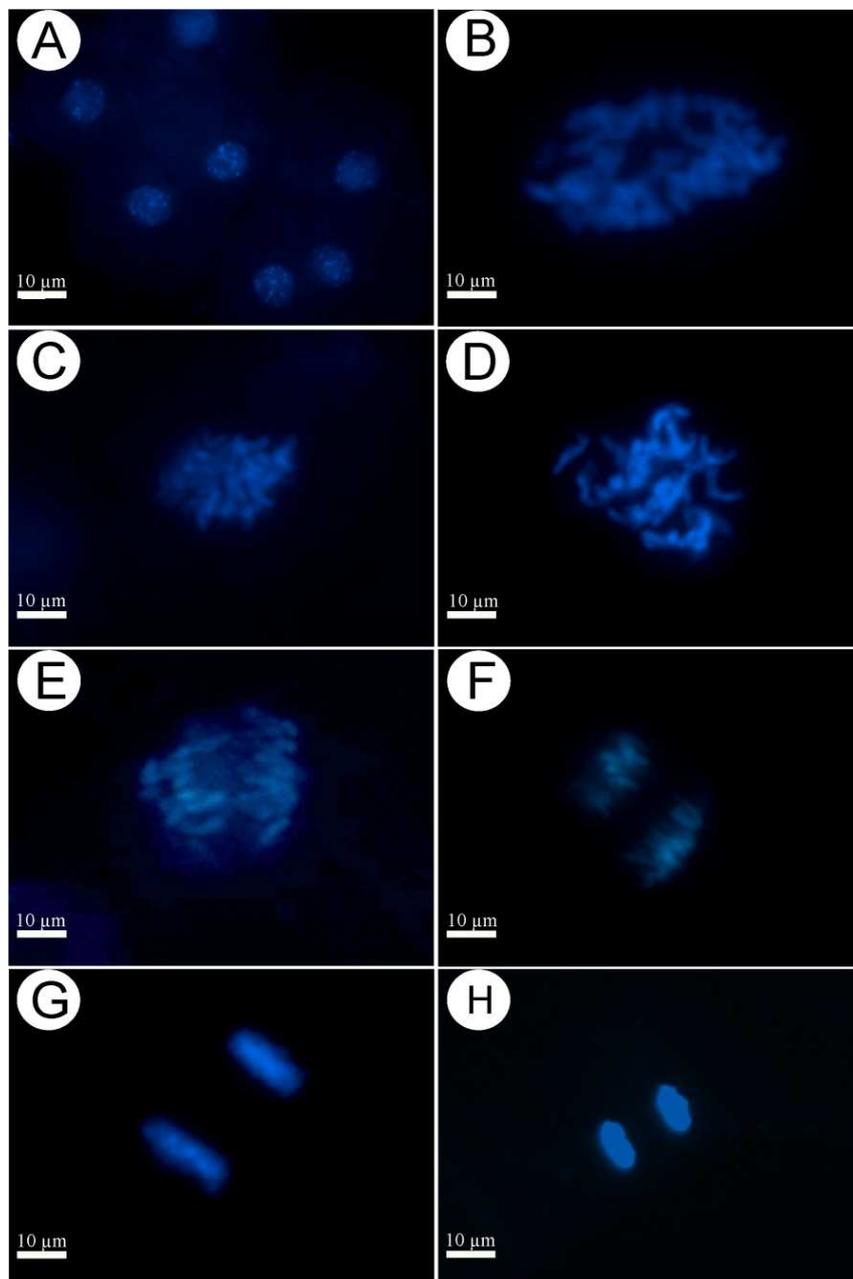
Considerando todas as fases e períodos de cultivo foram avaliadas 13586 células nos calos de *B. verbascifolia*, sendo possível observar células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 6). Dentre elas, 86% estavam no estágio de intérfase. Entre as células em divisão mitótica, a fase de maior frequência foi a prófase (76%) e a menor foi a anáfase (7%) (Tabela 2).

Através do teste de Scott-Knott, em uma primeira abordagem entre as fases, foi possível observar que os calos apresentaram maiores índices mitóticos nas fases *lag*, exponencial e linear, o qual decresceu significativamente na fase de declínio ( $p < 0,05$ ).

Nas fases *lag* e exponencial observou-se alta porcentagem de células em mitose, com média de 20,35% e 17,01%. Na fase linear foi observada uma menor taxa de células em divisão, com média de 9,76%. A fase de declínio apresentou média de 5,26% de células em divisão (Tabela 2).

Em uma segunda abordagem realizada entre os dias de cultivo, foi possível verificar de uma maneira mais pontual, que os maiores valores observados para o índice mitótico nas fases *lag* e exponencial foram aos 20 e 50 dias de crescimento, respectivamente, o qual decresceu significativamente nos demais dias de cultivo e apresentou menores valores aos 110-120 dias, isto é, na fase de declínio ( $p < 0,05$ ). Durante o período de cultivo de 10 dias e na fase linear os calos apresentaram os valores de índice mitótico que não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Aos 30 dias após a inoculação, na fase *lag*, houve um decréscimo de 7% do índice mitótico, sendo recuperado aos 50 dias da fase exponencial com um aumento de 3% das células em divisão. Após o período de 70 dias, na fase exponencial, o índice mitótico decresceu significativamente até o último dia de cultivo (Tabela 2).



**Figura 6** Ciclo celular em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Núcleos interfásicos (A); Prófase (B-C); Prometáfase (D); Anáfase (E-F); Telófase (G-H).

**Tabela 2** Número de células nas diferentes fases do ciclo celular de calos de *Byrsonima verbascifolia* durante as fases da cinética de crescimento

Cinética de crescimento	Período de cultivo	Total de células	Interfase (%)	Mitose (%)				Índice Mitótico
				Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
<i>Lag</i>	10 dias	947	90	64	0	12	24	10, 13 c
	20 dias	1496	76	84	5	7	4	23,93 a
	30 dias	1288	83	72	7	14	7	16,77 b
								$\bar{x}$ 20,35A
<b>Exponencial</b>	40 dias	1192	84	68	5	16	11	16, 11 b
	50 dias	1200	79	89	4	3	4	20,66 a
	60 dias	1117	84	92	5	0	3	15,76 b
	70 dias	1095	85	57	24	3	16	14,61 b
								$\bar{x}$ 17,01A
<b>Linear</b>	80 dias	1086	90	94	4	0	2	9,76 c
	90 dias	1125	90	59	4	4	33	10, 13 c
	100 dias	1102	92	80	12	8	0	8, 35 c
								$\bar{x}$ 9,76B
<b>Declínio</b>	110 dias	1101	95	40	46	0	14	5,27 d
	120 dias	837	95	67	0	20	13	5,26 d
								$\bar{x}$ 5,26C
<b>Total</b>		13586						

Médias seguidas pela mesma letra minúscula correspondem à comparação entre os dias de cultivo e não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Teste Scott-Knott. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula correspondem à comparação entre as diferentes fases de crescimento e não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Teste Scott-Knott.

#### 4.4 Análises ultraestruturais

##### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da microscopia eletrônica de varredura observou-se que os calos são formados por três tipos celulares: células pequenas e isodiamétricas, células grandes arredondadas e células alongadas, sendo que os dois últimos tipos celulares são células diferenciadas. A ocorrência desses tipos celulares é dependente da idade da cultura.

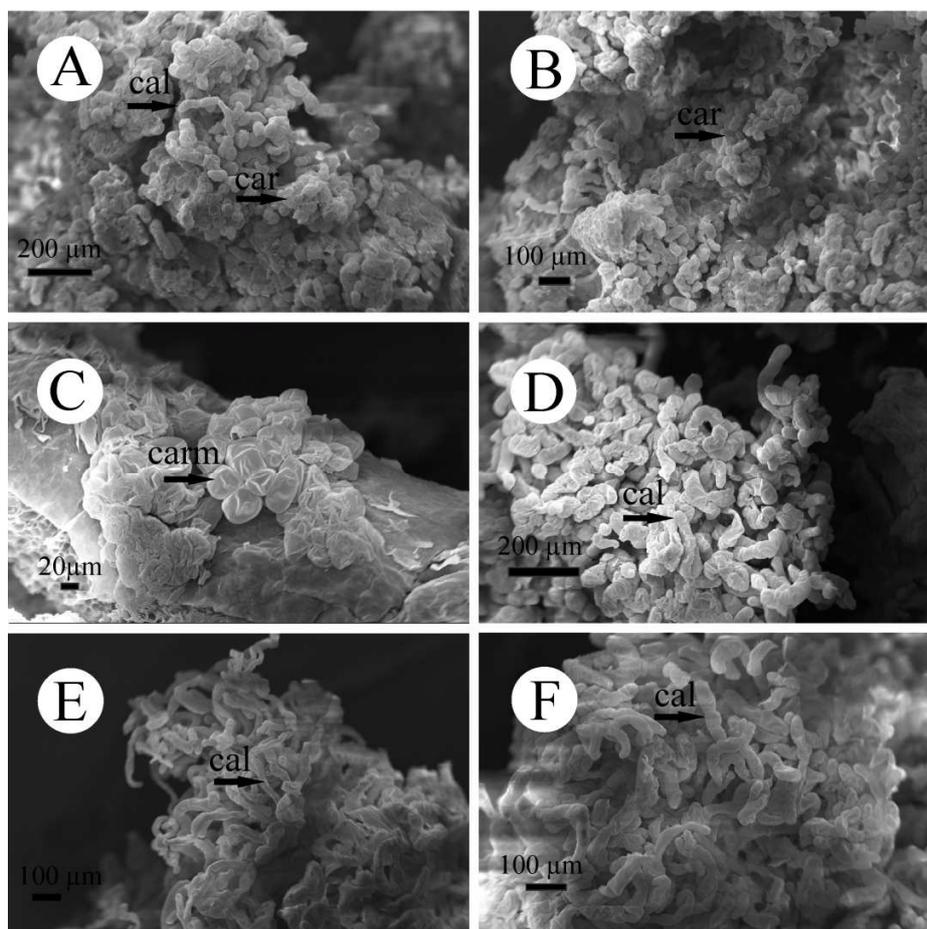
Os calos com coloração amarelada apresentaram células com predominância do formato isodiamétrico (Figura 7A-B), característica de calos embriogênicos, sendo, portanto, selecionados para esse estudo. Os calos brancos têm células com formas arredondadas e alongadas, porém murchas (Figura 7C-D). Os calos de coloração preta são formados por células alongadas (Figura 7E-F), e são células diferenciadas e não apresentam potencial embriogênico.

Os calos são formados por aglomerados de células heterogêneas e, portanto são constituídos por regiões com a predominância de diferentes tipos celulares (PÁDUA et al., 2013).

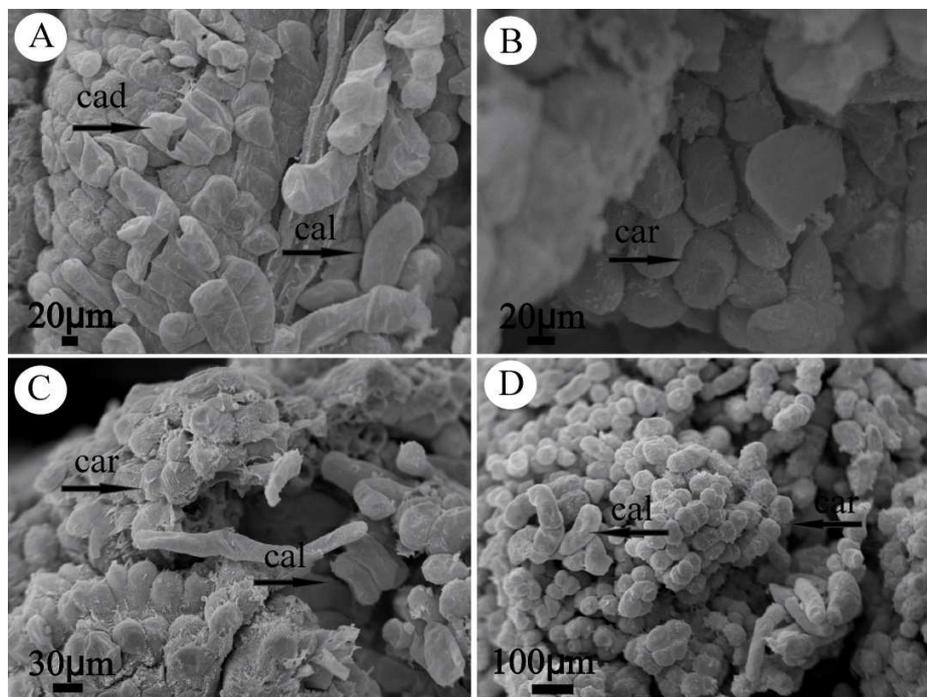
No período inicial do cultivo dos calos amarelos, as células apresentam formato alongado, passando para o formato arredondado e em seguida retornam para o formato alongado. No final do desenvolvimento dos calos, as células, em sua grande maioria, apresentam o formato alongado. Esses resultados mostram que as células mudam a sua forma de arredondada para alongada ao longo do cultivo.

Nos primeiros dias de cultivo da fase *lag* (até 10 dias), os calos apresentam regiões com a predominância de células alongadas, porém há regiões com algumas células arredondadas (Figura 8A-B). A partir do 20º dia, células

isodiamétricas com características meristemáticas são predominantes formando aglomerados celulares (Figura 8C-D).

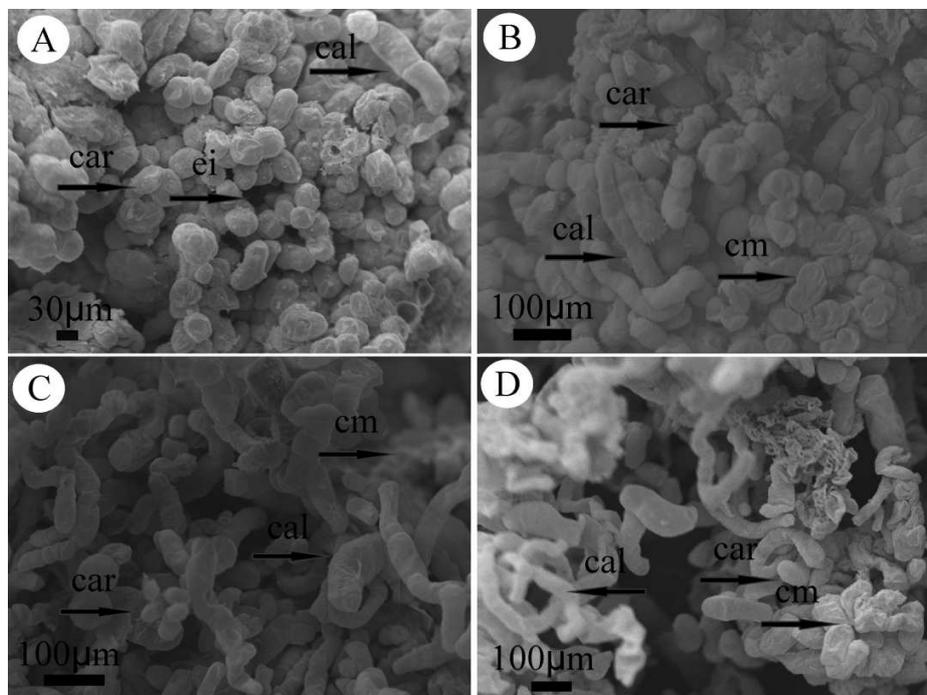


**Figura 7** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Calos de cor amarela (A-B); Calos de cor branca (C-D); Calos de cor preta (E-F). cal: células alongadas; car: células arredondadas; carm: células arredondadas murcha.



**Figura 8** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase lag: 10 dias de cultivo (A-B); 20 dias de cultivo (C) e 30 dias de cultivo (D). cad: células alongadas danificadas; cal: células alongadas; car: células arredondadas.

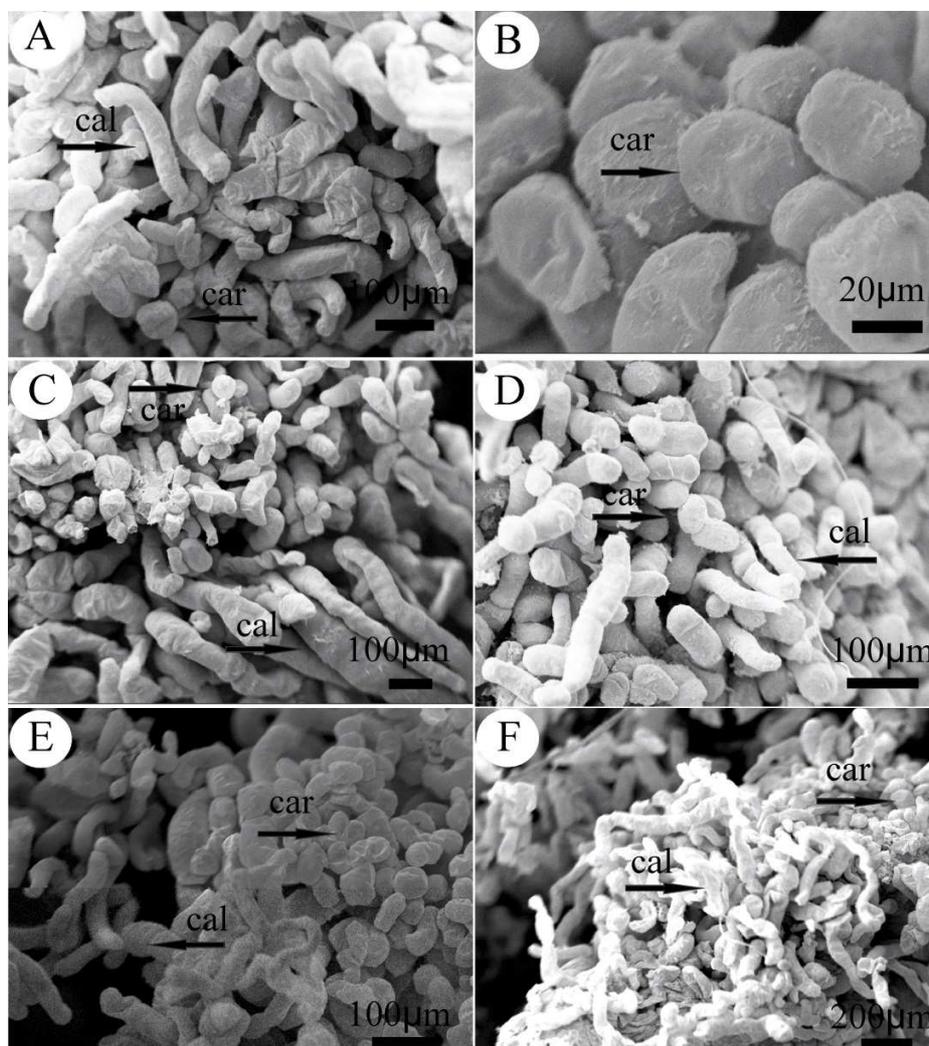
Aos 40° dia da fase exponencial, também há predominância de células arredondadas, porém estão começando a dispersar (Figura 9A). No período entre 50 a 70 dias os calos são formados por regiões de células alongadas, células arredondadas e grandes regiões de células murchas (Figura 7B-D). Aos 50 dias, as células arredondadas são pequenas e aos 60 e 70 dias são grandes.



**Figura 9** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase exponencial: 40 dias de cultivo (A); 50 dias de cultivo (B); 60 dias de cultivo (C) e 70 dias de cultivo (D). cal: células alongadas; car: células arredondadas; cm: células murchas; ei: espaço intercelular.

Na fase linear, entre 80° ao 110° dias de cultivo, os calos apresentam a predominância de células alongadas, com algumas pequenas regiões de células arredondadas com características meristemáticas (Figura 10A-E).

Ao atingir 120 dias, há predominância de células alongadas, conforme a Figura 10F.

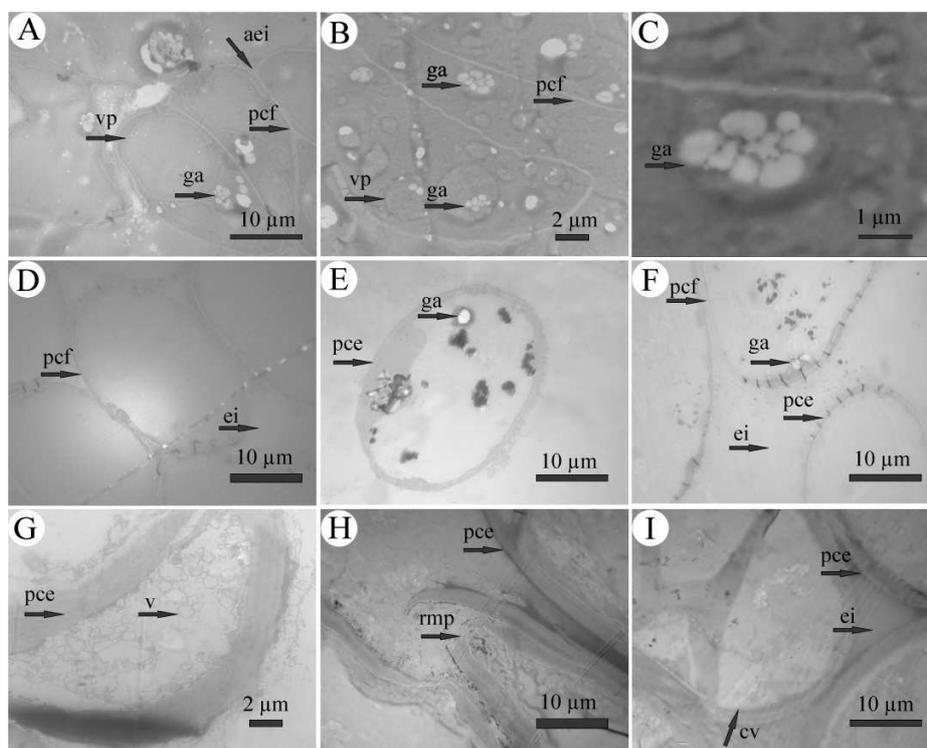


**Figura 10** Eletrofotomicrografias de varredura de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase linear: 80 dias de cultivo (A-B); 90 dias de cultivo (C) e 100 dias de cultivo (D); Fase de declínio: 110 dias de cultivo (E); 120 dias de cultivo (F). cal: células alongadas; car: células arredondadas.

#### 4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar as estruturas internas das células dos calos de *B. verbascifolia*, possibilitando identificar as características das células embriogênicas e não-embriogênicas.

Na fase *lag* (20 dias de cultivo), os calos são formados por células pequenas, justapostas, com vacúolo pequeno, parede celular delgada (Figura 11 A-B) e contendo grande quantidade de amiloplastídeos (Figura 11 C).



**Figura 11** Eletrofotomicrografias de transmissão de células de calos formados a partir de segmentos foliares de *Byrsonima verbascifolia*. Fase *lag*: 20 dias de cultivo (A-C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D) e 60 dias de cultivo (E); Fase linear: 80 dias de cultivo (F) e 100 dias de cultivo (G-I). vp: vacúolo pequeno; ga: grão de amido; pcf: parede celular fina; aei: ausência de espaço intercelular; ei: espaço intercelular; pce:

parede celular espessada; v: vesículas; rmp: rompimento da parede celular; cv: célula vacuolada.

Na fase exponencial, os calos são constituídos por células grandes com grãos de amido, vacúolo grande e parede celular fina e outras com paredes espessadas. Nesta fase há espaçamento entre as células (Figura 11 D-E).

Na fase linear foi possível observar células grandes, vacuoladas, com paredes espessas e outras com a parede fina. Algumas células apresentavam amido. Há grande espaçamento intercelular (Figura 11F).

Aos 100 dias de cultivo da fase linear, foi possível observar células em três estágios diferentes: células com grande quantidade de vesículas, células totalmente vacuoladas, sem organelas visíveis e células com a membrana celular rompida com extravasamento do conteúdo citoplasmático, mostrando o processo de senescência celular. Nesta fase também há grande espaço intercelular (Figura 11 G-I).

Na fase de declínio, os calos apresentam células vacuoladas, sendo ocupada apenas pelo grande vacúolo e células com grande quantidade de vesículas.

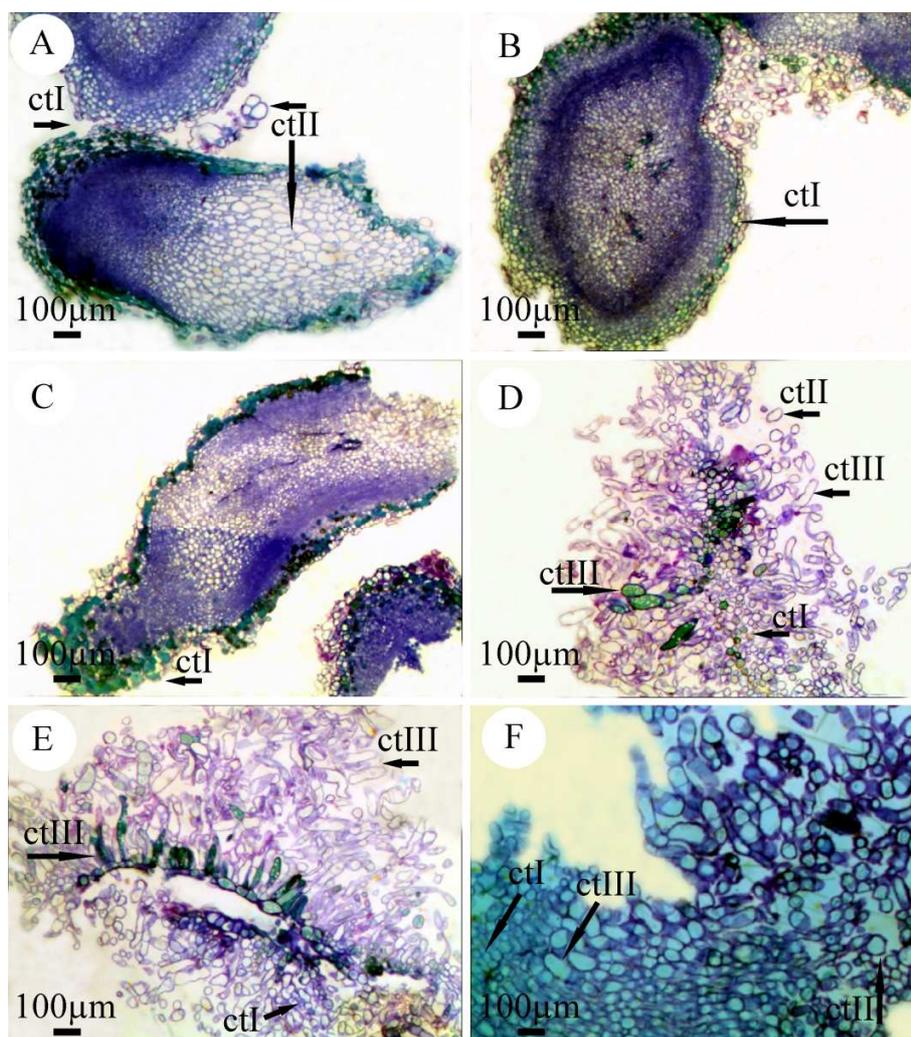
#### **4.5 Análise histoquímica**

A fixação dos calos em Karnovsky não alterou a presença das substâncias observadas, como o amido e compostos fenólicos.

Seções histológicas dos calos mostraram formação de áreas meristemáticas (Figura 12). Estas regiões distinguiram-se das demais por apresentarem células pequenas, isodiamétricas e com citoplasma denso.

Nos calos de *B. verbascifolia* foram observados três tipos celulares com morfologia diferentes foram identificados no presente estudo. O tipo I foi caracterizado por células pequenas e isodiamétricas, formando aglomerados

celulares. O tipo II, constituído por células arredondadas com grande volume celular, presente em aglomerados celulares ou dispersas dos aglomerados embriogênicos. O tipo celular III foi caracterizado por células alongadas dispersas ou associadas a aglomerados celulares (Figura 12).



**Figura 12** Aspectos histológicos e histoquímicos dos calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células verdes devido a ação metacromática do azul de toluidina marcando os

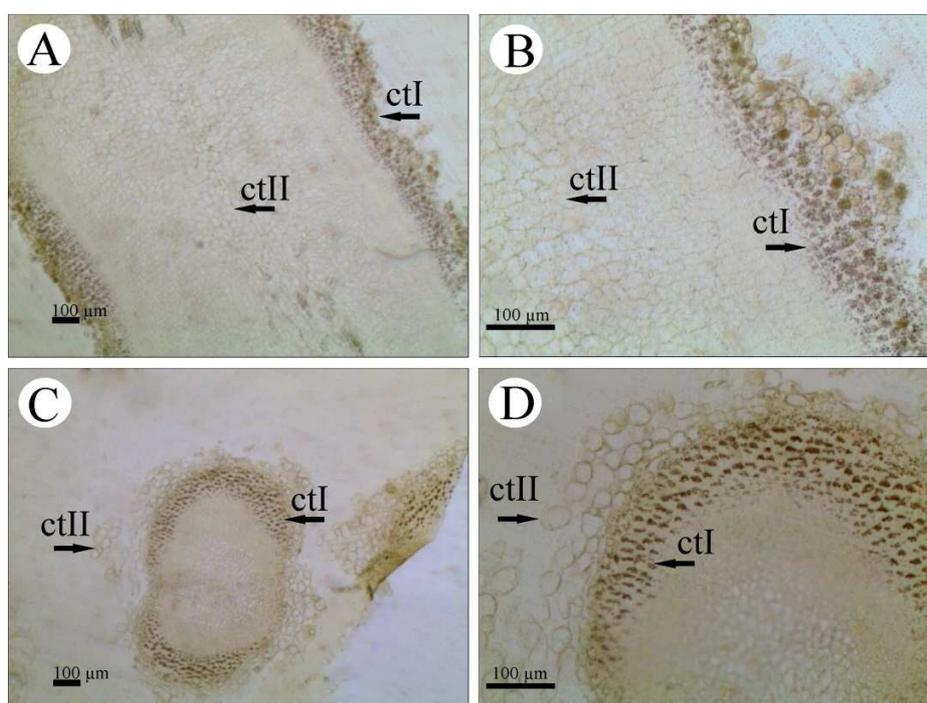
compostos fenólicos. Fase *lag*: 20 dias e cultivo (A-C); Fase exponencial: 40 dias de cultivo (D) e 60 dias de cultivo (E); Fase linear: 80 dias de cultivo (F). ctI: células do tipo I; ctII: células do tipo II; ctIII: células do tipo III.

Conforme mostrado na Tabela 3, com o azul de toluidina foi possível identificar compostos fenólicos, corados de verde claro, entre o período de 20 a 100 dias de cultivo (Figura 10), acumulados em algumas células isoladas ou tecidos.

**Tabela 3** Testes de histoquímica em calos de *Byrsonima verbascifolia* durante as fases da cinética de crescimento

Cinética de Crescimento	Períodos de Cultivo	Amido	Compostos fenólicos
		Lugol Enegrecido	Azul de Toluidina Verde Claro
<i>Lag</i>	20 dias	+	+
	30 dias	+	+
Exponencial	40 dias	+	+
	50 dias	+	+
	60 dias	+	+
	70 dias	+	+
Linear	80 dias	+	+
	90 dias	+	+
	100 dias	+	+
Declínio	110 dias	+	-
	120 dias	+	-

O teste com o lugol foi positivo em todos os períodos do crescimento dos calos, identificando histoquimicamente os grãos de amido de marrom escuro (Tabela 3 e Figura 13). Os grãos de amido estão presentes na periferia dos aglomerados celulares do tipo I, (Figura 13). Não foi observado amido em células do tipo II e III.



**Figura 13** Aspectos histológicos e histoquímicos de células do tipo I presentes em calos de *Byrsonima verbascifolia*. Células marrons marcando os grãos de amido devido a ação do lugol (A-D). ctI: células do tipo I; ctII: células do tipo II.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Cinética de crescimento dos calos de *Byrsonima verbascifolia*

A calogênese é influenciada por diversos fatores, como o tipo de explante, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento e a composição do meio de cultura (AHMED et al., 2011). A cinética de crescimento dos calos está relacionada com a espécie em estudo, o tipo e a idade do explante utilizado (FEITOSA et al., 2013). O 2,4-D e o BAP são reguladores de crescimento que funcionam como sinalizadores químicos a fim de induzir competência embriogenética ao explante (tecido matriz), provocando desdiferenciação do tecido, seguido de rediferenciação celular através de genes reguladores e processos epigenéticos (PERES, 2002).

Na literatura, não foram encontrados relatos de espécies pertencentes à família Malpighiaceae que apresentassem padrão de crescimento semelhante, ou seja, sem apresentar a fase de desaceleração, como observado nesse estudo para *B. verbascifolia*. Entretanto, há descrições para outras espécies, como no trabalho de Santos et al. (2003). Esses autores analisaram durante 84 dias o desenvolvimento das células de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi, caracterizaram a curva de crescimento com apenas três fases de crescimento, *lag*, exponencial e linear, fato explicado pela baixa velocidade de crescimento dos calos dessa cultivar.

Herrera et al. (2011) trabalhando com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), constatou que a curva de crescimento de calos, cultivados com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, se comporta da seguinte maneira: a fase *lag* ocorre até 20° dia, entre 20° ao 40° dia a fase exponencial, a fase linear do 40° ao 60° dia, do 60° e o 80° ocorre a fase de desaceleração, entre 80° ao 100° ocorre a fase de estabilização e a partir do 100° inicia-se a fase de declínio, sendo que a melhor

fase para a repicagem é a fase de entre o 60° a 80°, ou seja, a fase de desaceleração (60° a 80° dias), no qual há baixa taxa de nutrientes, secagem do agar e acúmulo de substâncias tóxicas.

A primeira fase da curva de crescimento é determinada como fase *lag*. Nesta etapa há produção de energia, síntese de proteína e mobilização de metabólitos, ou seja, as células do explantes estão se preparando para iniciar a divisão celular (FEITOSA et al., 2013).

Nesta fase, o crescimento é lento, pois as células do explante estão se adaptando com o novo ambiente e com as novas condições fisiológicas e nutricionais (AL-KHAYRI, 2012), pois ao trocar as células dos explantes de meio há um choque na osmolaridade (MARTINEZ; PARK, 1993).

Os resultados deste estudo diferem do trabalho de Herrera et al. (2011), no qual observaram que para o murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) a fase *lag* ocorre até o 20° dia após a inoculação. No estudo de Stein et al. (2010) com o ingazeiro (*Inga vera*), a fase *lag* foi verificada até o 40° dia de cultivo.

A fase exponencial é o período mais duradouro do crescimento celular. Nesta etapa, o carbono consumido é utilizado para o acúmulo de biomassa (VALLE et al., 2006), portanto há um progressivo acúmulo de matéria fresca e seca. O declínio do crescimento entre os 50 e 60 dias de cultivo pode ter ocorrido pela seleção de calos com baixo vigor, tornando a curva atípica. Esta fase foi longa quando comparada com outro estudo em *B. intermedia*, em que a fase exponencial foi observada entre o 20° ao 40° dia de cultivo (HERRERA et al., 2011), e entre 40° ao 50° dias após a inoculação para o ingazeiro (STEIN et al., 2010).

No período linear, o crescimento e desenvolvimento celular são mais evidentes (LANDA et al., 2000), pelo fato das células crescerem em volume (FEITOSA et al., 2013). Após a máxima divisão celular ser alcançada, o máximo acúmulo de matérias fresca e seca também é atingido e, por esta razão,

as maiores médias de matéria fresca foram observadas na fase linear e não na exponencial, que tem intensa atividade mitótica.

Herrera et al. (2011) observaram que a fase linear no *B. intermedia* ocorre entre o 40° ao 60° dia após a inoculação. Para o ingazeiro, esta fase ocorre entre o 50° e o 70° dia de cultivo (STEIN et al., 2010), sendo a duração desta fase semelhante para *B. verbascifolia*.

Os calos de *B. verbascifolia* não apresentaram a fase de desaceleração, fato explicado pelo cultivo ter sido realizado no escuro. Quando as células são cultivadas na presença de luz, em certo período há o consumo total dos carboidratos, tornando a concentração de fontes de carbono do meio de cultura escasso, e como consequência as células atingem a fase de desaceleração do crescimento (VALLE et al., 2006).

Os metabólitos secundários são encontrados em maiores concentrações na fase estacionária, pois nas fases iniciais, no qual o crescimento é muito ativo, as células alocam o carbono para a construção de estruturas celulares e respiração. Quando o crescimento cessa os metabólitos secundários são sintetizados mais ativamente, pois o carbono já não é tão necessário no metabolismo primário. Nesta etapa não há síntese de biomassa (BOURGAUD et al., 2001).

A fase estacionária também não foi observada em *B. verbascifolia*. O estudo da cinética de crescimento com intervalos de coletas mais curtos, poderia permitir a certificação se do número exato de fases que ocorrem no cultivo *in vitro* dessa espécie. Em *B. intermedia* e *Inga vera*, no qual a fase estacionária durou 20 dias, estendendo-se entre o 80° ao 100° dia (HERRERA et al., 2011), e entre o 70° ao 90° dia (STEIN et al., 2010).

Na fase de declínio, o meio de cultura possui baixa concentração de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (FEITOSA et al., 2013) e os calos tornam-se escuros. Esses pigmentos podem estar relacionado

com a senescência do calo, devido ao estresse surgido pelo possível déficit de nutrientes, água e/ou reguladores de crescimento, ocasionando o aumento de radicais livres, tóxicos para as planta (VALLE et al., 2006). Por este motivo, os resultados observados eram esperados, ou seja, o decréscimo de matéria fresca, pois neste período as células não são capazes de realizar divisão celular e entram em processo de senescência (SANTOS et al., 2013). Os resultados são semelhantes aos encontrados em *B. intermedia*, em que a fase de declínio ocorreu aos 100° dia de cultivo (HERRERA et al., 2011).

O conhecimento da cinética de crescimento dos calos possibilita gerar subsídios para a seleção de células com maior capacidade embriogênica, o período com maior acúmulo de metabólitos secundários e o período ideal para o subcultivo, que nos calos de *Byrsonima verbascifolia*, poderá ocorrer aos 100 dias, quando ocorre desaceleração no seu crescimento.

## 5.2 Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular, acompanhado de outros testes como o índice mitótico e o formato celular, fornecem informação acerca da capacidade da regeneração de células com potencial embriogênico (SILVA et al., 2012a).

Comparando a viabilidade celular entre as fases da cinética de crescimento dos calos de *B. verbascifolia*, verificou-se que as fases lag, exponencial e linear apresentam alta capacidade proliferativa, enquanto na fase de declínio os calos são formados por baixa porcentagem de células vivas. A redução destas células é uma resposta esperada, uma vez que neste período há baixa taxa de divisão celular, escassez de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas.

Ao analisar a viabilidade celular entre os dias de cultivos dos calos de *B. verbascifolia* foi possível identificar dois períodos com elevada porcentagem de

células vivas, aos 20 dias de cultivo na fase *lag* e aos 40 dias na fase exponencial, indicando que neste período as células tem potencial para multiplicação e podendo ser realizado o subcultivo e a repicagem. A viabilidade celular máxima observada nestes períodos é semelhante aos estudos de SILVA et al. (2012a), que utilizou FDA para determinar a viabilidade celular em três subcultivos de *B. intermedia* observando que a máxima porcentagem de células viáveis foi atingida aos 25°, 29° e 21° dias após a inoculação para 1°, 2° e 3° subcultivo, respectivamente.

Aos 30 dias da fase *lag* e 90 dias da fase linear os calos apresentam alto poder regenerativo, sendo comprovado pela alta porcentagem de células viáveis.

Apesar de utilizar metodologia diferente para a determinação da viabilidade celular, Santos et al. (2013) usando trifeniltetrazólio (CTT), observou dois períodos máximos de células viáveis, no dia da inoculação e entre os 28 a 35 dias de cultivo, em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

A redução da viabilidade celular, observado entre o período de 50 a 110 dias, com exceção dos 90 dias de cultivo, no qual engloba o final da fase exponencial, fase linear e início da fase de declínio, indica que neste período os calos estão começando a perder a sua capacidade de multiplicação.

Aos 120 dias de cultivo no final da fase de declínio os calos apresentam grande quantidade de células em senescência, sendo comprovado pela baixa viabilidade celular, a qual difere das demais fases do cultivo.

Esses resultados demonstraram que a época ideal para a repicagem e transferência de células com potencial embriogênico nessa espécie, sem a perda de viabilidade celular, não deve ultrapassar o 100° dia, ainda na fase linear.

### 5.3 Índice mitótico

De acordo com Alberts et al. (2008) a interfase é a fase do ciclo celular mais longa, dessa forma, a maior porcentagem de células no estágio de interfase era esperado, mesmo em cultura de calos.

Comparando o índice mitótico das fases da cinética de crescimento dos calos de *B. verbascifolia*, verifica-se, como esperado, que nas fases *lag* e exponencial foram observadas as maiores porcentagens de células em divisão, mostrando que a interação entre 2,4-D e BAP apresentou efeito estimulatório no ciclo celular, nestas fases.

As quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação. Quando auxina está presente isoladamente no meio de cultura, há um aumento do nível de quinases dependentes de ciclina e a adição das citocininas é necessária para a ativação das quinases (KERBAUY, 2008). Portanto, as auxinas e citocininas são necessárias para a sinalização e indução da divisão celular, tornando possível que as células entrem novamente no ciclo celular (BORGIO, 2010).

Herrera et al. (2011) avaliaram o índice mitótico de calos de *Byrsonima intermedia*, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 3% de sacarose, utilizando DAPI como fluorocromo, constatando que os maiores índices de divisão celular ocorrem aos 20 e 40 dias apresentando o máximo de divisão celular observado na curva (17 e 18,16%, respectivamente). A partir dos 60 dias houve redução no índice mitótico, caindo para 6% aos 80 dias e 2% aos 120 dias de cultivo.

Na fase linear, as células já estão preparadas para a dediferenciação celular havendo decréscimo do índice mitótico nesta fase, pois há poucas células com capacidade de multiplicação (SANTOS et al., 2013).

Na fase de declínio, as células começam a entrar em apoptose (SANTOS et al., 2013), fato que explica as menores porcentagens de células em divisão

nesta fase, que é significativamente menor das demais fases da cinética de crescimento dos calos de *B. verbascifolia*.

A apoptose ou morte celular programada é importante para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, pois é responsável por eliminar células defeituosas ou supérfluas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Ao comparar o índice mitótico dos dias de cultivo observou-se que no início da fase *lag* (10 dias) as células ainda estão sofrendo estresse referente à inoculação. A máxima divisão celular foi observada no final da fase *lag* (20 dias), no qual as células se recuperaram desse estresse.

Os calos de *B.verbascifolia* apresentam um longo período, entre 30 dias da fase *lag* a 70 dias da fase exponencial, com grande quantidade de células em divisão celular, indicando que neste período os tecidos estão em crescimento ativo. A repicagem e o subcultivo podem ser feito neste intervalo sem que haja perda na capacidade de multiplicação das células.

O índice mitótico entre o período de 80 a 100 dias da fase linear se comportam de maneira semelhante e são baixos, mostrando que as células estão começando a envelhecer.

O processo de senescência está relacionado com o tamanho dos telômeros. A medida que os telômeros diminuem as células apresentam mais sinais de envelhecimento. Esta teoria genética é conhecida com limite de Hayflick no qual as células apresentam uma quantidade máxima de divisão. Células cultivadas podem se dividir aproximadamente cinquenta vezes antes de morrer, podendo variar de acordo com o tamanho dos telômeros e tipos de organismos (FARINATTI, 2002; KHOKHLOV, 2013).

Entre o período de 110 e 120 dias os calos já estão perdendo a sua capacidade de regeneração, sendo comprovado pelo baixo índice de células em

divisão, no qual difere significativamente de todos os demais períodos de cultivos.

Os resultados demonstram que o período ideal para a repicagem de células com potencial embriogênico nessa espécie, não deve ultrapassar o 70º dia da fase exponencial, pois as células apresentam elevada capacidade de regeneração comprovado pelo alto índice mitótico.

#### **5.4 Análises ultraestruturais**

##### **5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Células grandes, alongadas e altamente vacuolizadas são predominantes nos calos não embriogênicos, de maneira antagônica, as células características dos calos com potencial embriogênico são pequenas de formato esférico e citoplasma denso (PEREIRA et al., 2012). Os resultados demonstram que os calos com coloração amarela apresentam características compatíveis com calos embriogênicos.

Por meio das eletrofotomicrografias de varredura foi possível observar a mudança do formato celular ao longo do cultivo com a suplementação dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP, sendo estes essenciais para a sinalização de desdiferenciação celular, seguido da aquisição de características meristemáticas.

O explante é um tecido diferenciado, portanto não apresenta células com características meristemáticas, o que explica a existência das células com formato alongado aos 10 dias, e as células ainda estão no período de estresse.

Entre 20 e 40 dias de cultivo foi observada a predominância de células isodiamétricas com capacidade embriogênica. Provavelmente 20 dias é o tempo necessário para que ocorra desdiferenciação celular.

Na fase linear e na fase exponencial, os calos são formados por três tipos de células (alongadas, isodiamétricas e arredondadas grandes) até o final do cultivo, indicando que nessas fases os calos estão acumulando biomassa e não convertendo aglomerados celulares isodiamétricos em embriões.

O primeiro sinal de morte celular é a vacuolização, ocasionando o alongamento das células, seguido de rupturas das membranas citoplasmáticas (FILONOVA et al., 2000), o que pode explicar a presença de apenas células alongadas na fase de declínio que estão em processo de senescência.

Nogueira et al. (2008) ao observarem as células de três subcultivos de calos de *B. intermedia*, por meio de microscopia eletrônica de varredura, verificaram a predominância de células alongadas no cultivo inicial e primeiro subcultivo e células arredondadas no segundo e terceiro subcultivo. Estes resultados corroboram com o presente estudo, uma vez que as células mudam de formato de acordo com o tempo de cultivo em que são expostas ao 2,4-D, induzindo a desdiferenciação celular, no qual podem gerar células com potencial embriogênico.

A presença de células arredondadas, com característica meristemática, em todos os períodos de cultivo possibilita a indução de células embriogênicas, e obtenção de embriões somáticos. A criopreservação destes embriões possibilita a conservação de *B. verbascifolia in vitro*.

#### **5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

As análises de microscopia eletrônica foram realizadas aos 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias de cultivo, de acordo com os resultados obtidos nas análises de viabilidade celular e índice mitótico.

Os resultados obtidos na fase *lag* mostram que as células observadas apresentam características meristemáticas, devido à formação de aglomerados celulares, constituído por células pequenas e esféricas.

A ausência de espaços intercelulares permite uma maior densidade de células por tecido. Os vacúolos pequenos possibilitam maiores espaços para as organelas, no qual duplicam durante a divisão celular. A parede celular delgada também facilita a divisão celular, além de permitir no influxo de nutrientes para a célula (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A presença de inúmeros amiloplastídeos está relacionada com a alta atividade metabólica, pois o amido é fonte primária de energia para a divisão celular (PÁDUA et al., 2013).

Algumas células observadas na fase exponencial não apresentam potencial embriogênicos devido a características como vacúolo grande, ocupando quase todo o conteúdo celular, no qual está relacionado com a morte celular programada (FILONOVA et al., 2000).

Os espaços intercelulares, observados nesta fase, indicam que não há formação de aglomerados celulares, porém ainda é possível observar a presença de poucos grãos de amido.

O espessamento da parede celular, observado nas subseqüentes da cinética de crescimento os calos, indica individualização celular (LIU et al., 2006).

As células entram em senescência após determinado número de divisão celular, perdendo sua capacidade proliferativa. Este processo é ativado por programação genética que envolve deterioração dos telômeros. Na senescência as células mudam o formato. Os vacúolos se fundem, tornando as células vacuoladas. Há condensação da cromatina que se mantém em torno da membrana nuclear. Algumas organelas, como as mitocôndrias e os plastídios, também alteram a sua morfologia. O núcleo se desintegra, formando pequenos

fragmentos. Em seguida há formação de pequenas vesículas que se fundem aos vacúolos por rupturas do tonoplastos. Estes são responsáveis pela degradação do conteúdo citoplasmático. O tonoplasto se funde com a membrana plasmática e então lança as vesículas entre a parede celular e a membrana plasmática, havendo a degradação das mesmas. (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; DOORN 2011; NI et al., 2014).

As vesículas observadas no citoplasma celular, nas fases linear e declínio, são responsáveis pela degradação das organelas, indicando a autólise, seguidas da ruptura da membrana celular ilustrando o processo de senescência.

Nogueira et al. (2007) estudando a morfologia de calos de *Byrsonima intermedia* através das análises do material em MET foi possível visualizar células do primeiro subcultivo com núcleos desorganizados, poucos retículos endoplasmático, complexos de Golgi e mitocôndrias com poucas cristas, e presença de amiloplastos. No terceiro subcultivo, as células apresentaram núcleos mais organizados, nucléolos mais proeminentes, muitas mitocôndrias com formato oval e visualização das cristas, maior presença de amiloplastos, e pouca ocorrência de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi. As células adquiriram formato isodiamétrico com estruturas subcelulares que caracterizam células meristemáticas evidenciando a capacidade embriogênica.

### **5.5 Análises histoquímicas**

Segundo Torres (2013) células com grãos de amido indicam alta atividade energética, sendo utilizados para iniciar e manter o desenvolvimento dos calos, sendo também viável para aquisição de competência embriogênica. Este fato explica a presença de amido, em todos os períodos do cultivo, apenas nas células do tipo I, que apresentam características meristemáticas.

As células do tipo II e III podem ser consideradas células não meristemáticas e em processo de maturação, devido ao formato celular indicando que estas células estão em processo de diferenciação celular.

Os tipos de massas celulares obtidas são influenciados pela interação dos reguladores de crescimento usados e com a posição da folha utilizada para a indução dos calos. Como observados por Pádua et al. (2013) que obteve quatro tipos de células de acordo com posição da folha usada como explante. As células do tipo I são células alongadas, vacuolizadas e com rupturas na parede celular indicando possível morte celular, células inviáveis. As células do tipo II são células pequenas, isodiamétricas, indicada para obtenção de plantas por via indireta. As células do tipo III e IV formam estruturas globulares contendo muitos grãos de amido. Sendo que a do tipo III apresentou mais características embriogênicas, devido à presença de núcleo com nucléolo visível, mitocôndrias, fenóis e lipídeos.

A estrutura química dos compostos fenólicos é formada por grupos químicos específicos que são identificados apenas por determinados reativos e por grupos químicos comuns aos compostos fenólicos, apresentando a mesma coloração quando em contato com o reativo. Assim, torna-se necessário a utilização simultânea de mais de uma reação cromática para o reconhecimento e confiabilidade dos metabólitos nas células (RODRIGUES et al., 2009).

O azul de toluidina é um corante metacromático, no qual exhibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage, permitindo visualizar e identificar as células. Cora as mucilagens e as paredes celulares rica em pectina de roxo, parede celulósica de azul e as paredes lignificadas e compostos fenólicos de verde.

Os compostos fenólicos estão presentes nos três tipos celulares, podendo ser observado em inúmeras regiões dos calos. Segundo Pfluger e Zambryski (2001) os compostos fenólicos podem funcionar como uma barreira simplástica,

no qual impulsiona uma mudança morfológica, favorecendo o surgimento dos embriões somáticos na região isolada.

Os compostos fenólicos foram degradados no final do período de cultivo (110 e 120 dias).

A ontogênese, ou seja, o início da formação dos calos, pode ser uma informação importante para a otimização de protocolos de obtenção de células embriogênicas. Dessa forma é importante a realização de um estudo metuculoso de cada estágio de desenvolvimento dos calos possibilitando uma análise tridimensional dos mesmos, permitindo a identificação da sua origem de formação.

#### **5.6 Análise integrada da viabilidade celular, índice mitótico, ultraestrutura e teste de histoquímica**

Os calos de *B. verbascifolia* aos 10 dias da fase *lag* são formados por pequenas regiões com células arredondadas e predominantemente, por regiões de células alongadas, no qual são células diferenciadas que apresentam baixa capacidade de divisão, justificando o baixo índice mitótico deste período.

A partir de 20 dias da fase *lag*, os calos são constituídos por aglomerados celulares com características meristemáticas, como o formato isodiamétrico, pouco espaço intercelular, vacúolos pequenos, parede celular delgada, presença de amiloplastídeos, que foi confirmado pelo teste positivo com o lugol. Essas características são comprovadas pelas análises ultraestruturais, alta viabilidade celular e índice mitótico, mostrando que as células apresentam elevada capacidade de regeneração. Aos 40 dias da fase exponencial as células isodiamétricas estão começando a dispersar, característica observada através das análises ultraestrutural e da ação metacromática do azul de toluidina.

No período de 50 a 70 dias da fase exponencial os calos são formados por regiões de células alongadas e isodiamétricas. O alto índice mitótico dessa etapa pode ser explicado pela presença de células com capacidade de divisão (células arredondadas). A baixa viabilidade celular neste período pode ser explicada pela presença de células murchas que não são viáveis.

Entre 80 e 90 dias da fase linear os calos são formados por regiões de células alongadas e arredondadas, neste período os calos ainda tem capacidade de proliferação, no qual é comprovada pelos altos valores da viabilidade celular que é recuperando em relação ao período anterior devido a presença de regiões com células que apresentam características meristemática. Como estes calos também apresentam muitas células diferenciadas, que não se dividem, o índice mitótico neste período é baixo. As análises ultraestruturais mostraram células alongadas com espaço intercelular, vacúolo grande, parede celular espessa e presença de alguns grãos de amido, comprovada pelo teste positivo com o lugol.

A partir dos 100 dias da fase linear, os calos são constituídos por regiões alongadas com algumas de células arredondadas. Neste período as células apresentam baixa capacidade de regeneração, sendo comprovado pela baixa viabilidade celular e índice mitótico. Através das análises ultraestruturas e dos testes de histoquímica é possível que observar que estas células não apresentam potencial embriogênicos, devido ao grande espaço intercelular, vacúolos grandes, parede células espessa e ausência ou pouca quantidade de grãos de amido.

Os calos do período de 120 dias de cultivo são formados predominantemente por regiões de células alongadas, com algumas células arredondadas dispersas. Neste período as células estão em senescência, sendo comprovada pela baixa viabilidade celular, índice mitótico e análises ultraestruturais, no qual foi possível observar corpos apoteóticos, aumento do vacúolo, parede celular espessa e ruptura da membrana citoplasmática.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

*B. verbascifolia* apresenta quatro fases de crescimento de calos: lag, exponencial, linear e declínio.

A viabilidade celular, índice mitótico e a morfologia das células respaldam a cinética de crescimento das células de *B. verbascifolia*.

Os calos de *B. verbascifolia* são constituídos em sua grande maioria de células viáveis até os 110 dias de cultivo da fase exponencial, apresentando neste período elevada capacidade de multiplicação.

Aos 70 dias de cultivo da fase exponencial as células dos calos apresentam elevado índice mitótico, sendo que neste período os calos apresentam alto potencial de proliferação.

As células dos calos amarelos de *B. verbascifolia* apresentaram evidências, em nível celular, de competência embriogênica.

Os calos de *B. verbascifolia* são constituídos de regiões de células alongadas, diferenciadas, e de células arredondadas, com característica meristemática, tornando possível a obtenção de células embriogênicas em todos os períodos de cultivo.

A repicagem, o subcultivo, bem como o momento ideal para iniciar uma suspensão celular dos calos de *B. verbascifolia* devem ser realizados até os 70<sup>o</sup> dias após a inoculação, pois apresentam elevada viabilidade células, índice mitótico e os calos são formados por regiões de células isodiamétricas com características embriogênicas, sendo possível selecionar células com maior capacidade embriogênica.

## REFERÊNCIAS

AHMED, A.B.A.; PALLELA, R.; RAO, A.S.; RAO, M.V.; MAT TAHA, R. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phyla nodiflora*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.9, n.4, p.122-1270, 2011.

ALBERTS, B; BRAY, D; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular** – Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula. Ed. Artmed. Porto Alegre, 757p., 2008.

AL-KHAYRI, J.M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.24, n.5, p. 444-455, 2012.

ALTMAN, S.A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Bibotechnology Progress**. v.9, p.871-874, 1993.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 43p. 2004.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**; Viçosa - Editora UFV, 438p. 2006.

ARAÚJO, J.A.; AZEVEDO, A.A.; SILVA, L.C.; MEIRA, R.M.S. Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). **Plant Systematics and Evolution**, v. 286, p. 117-131, 2010.

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

BIEYSSE, C.; GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1496-1502, 1993.

BORGO, L. **Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 a pH baixo durante a retomada do ciclo celular**. 2010. 86f. Tese doutorado em Ciências, área de concentração em Biologia na Agricultura e no Ambiente – Universidade de São Paulo.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Cambridge, v.161, p. 839-851, 2001.

CASTRO, A. H. F.; ALVARENGA, A. A. de; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C. Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo *in vitro* de embriões. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.1, n.1, p.1-7, 2005.

CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr., 2009.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 234p. 2009.

CORTE, V.B. VENTRELLA, M. C.; BORGES, E. E. L. E; PONTES, C. A.; PINHO, D. Histochemical and ultrastructural study of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae) seeds. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p. 10-20, 2009.

DANKBERG, F.; PERSIDSKY, M.D. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic functionlp. **Cryobiology**, v.13, p.436-432, 1976.

DOORN, W.G.V. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, p.1-13, 2011.

ERIG, A.G.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, jul./ago., 2005.

FARINATTI, P.T.V. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n4, jul/ago, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, n.3, p.201-228, 2003.

FEITOSA, L.S.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M.P.; BLANK, A.F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 370-377, mar./abr. 2013.

FELFILI, J.M.; NOGUEIRA, P.E.; DA SILVA JÚNIOR, M.C.; MARIMON, B.S.; DELITTI, W.B.C. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa – MT. **Acta Botanica Brasílica**, v.16, n.1, p.103-112, 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M.E.; MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; DOS SANTOS, L.C.; ALMEIDA, L.F.R.; BRITO, A.R.M.S; SALGADO, H.R.N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, jan./mar. 2005.

FILONOVA, L.H.; BOZHKOVA, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, London, v.113, n.24, p.4399-4411, Dec. 2000.

FRANCHI, L.P.; SANTOS, R.A.; MATSUBARA, E.Y.; LIMA, J.C.; ROSOLEN, J.M.; TAKAHASHI, C.S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Química Nova**, São-Paulo, v.35, n.3, p. 571-580, 2012.

FRANKFURT, O.S. Assessment of cell viability by flow cytometric analysis using dnase exclusion. **Experimental Cell Research**, v.144, p. 251-511, 1983.

FRAZIER, R.A.; DEAVILLE, E.R.; GREEN, R.J.; STRINGANO, E.; WILLOUGHBY, I.; PLANT, J.; MUELLER-HARVEY, I. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 490-495, Jan. 2010.

GADANO, A.; GURNI, A.; LOPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.11-16, 2002.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p: 335-343, 2007.

GUERRA, P.G.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, I.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA: Brasília, v. 2, p. 533-568, 1999.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M.M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, São-Paulo, v.34, n.6, p.1032-1041, 2011.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F.A.; FONSECA, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* rich. Ex A. juss.). **Cerne**, Lavras, v.12, n.01, p. 84-91, 2006.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsber. Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien.**, 111:69-92, 1902.

HAO, Y.J.; YOU, C.X.; DENG, X.X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1123-1127, 2002.

HERNLEM, B.; HUA, S.S. Dual fluorochrome flow cytometric assessment of yeast viability. **Currents Microbiology**, v.63, p.57-63, 2010.

HERRERA, R.C.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; SALGADO, C.C.; MAGALHÃES, M.M.; SOARES, F.P.; Índice mitótico e viabilidade celular de calos embriogênicos de murici-pequeno. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.54, n.1, p.28-32, Jan./Abr. 2011.

HERZOG-SOARES, J.; ALVES, R.K.; ISAC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.H.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnoendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, p. 1-2, 2002.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Books: New York, 523p. 1940.

JONES, K. H.; SENFT, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 33, n.1, p. 77-79, 1985.

KANESHIRO, E.S.; WYDER, M.A.; WU, Y.P. Cushion, M.T. Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. **Journal of Microbiological Methods**, v.17, p. 1-16, 1993.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**, 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p. 2008.

KHOKHLOV, A.N. Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochasticity? **Russian Journal of Developmental Biology**, v.44, n.6, p. 336-341, 2013.

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

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, p. 71-81, 2009.

LIU, C.; XIA, X.; YIN, W.; HUANG, L.; ZHOU, J. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 621-628, Feb. 2006.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacological**, Leiden, v.99, p.265-272, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras** - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, v. II, 352p. 1998.

MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group, **Annals of Botany**, v.57, n.4, p. 443-462, 1986.

MARTINEZ, B. C.; PARK, C.H. Characteristics of batch suspension cultures of preconditioned *Coleu blumei* cells: sucrose effect. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 97-100, 1993.

McCLEARY, B. V., MATHESON, N. K. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. **Phytochemistry**, v.15, p.43-47. 1976.

MICHAUX-FERRIERE, N., BIEYSSE, D., ALVARD, D., DUBLIN, P. Étude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé.**, v. 33, p. 207-217, 1989.

MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P.S., SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantas foliaires de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.; BICCADODE, L.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.72-81, 2006.

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

MUTHUSAMY, A.; VIDYA, K.S.; PRATIBHA, P.K.; RAO, M.R.; VIDHU, S.B.; GURUPRASAD, K.P.; RAGHAVENDRA, U.; GOPINATH, P.M.; SATYAMOORTHY, K. Establishment of an in vitro plantlet regeneration protocol for unique varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) var. Mattu Gulla and Perampalli Gulla. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.52, p.80-88, 2014.

NASCIMENTO, R.S.M.; CARDOSO, J.A.; OLIVEIRA, L.D.; OLIVEIRA, J.S.; COCOZZA, F.D.M.; CORTES, J.M. Caracterização físico-química de muricis (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) produzidos na região Oeste da Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v.23, n.4, p. 236-242, Out./Dez. 2011.

NI, X.L.; MENG, Y.; ZHENG, S.S.; LIU, W.Z. Programmed cell death during aerenchyma formation in *Thipha angutifolia* leaves. **Aquatic Botany**, v. 113, p. 8-18, 2014.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; PORTO, J.M.P.; NICIOLI, P.M. Análise Ultra-estrutural de Calos Embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.2, p. 48-50, Jul.2007.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** v.59, p. 367-373, 1964.

PÁDUA, M.S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n4, p. 1545-1556, 2013.

PEREIRA, D.M.S.; OLIVEIRA, L.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F.; SILVA, M.L.C.; KOBLITZ, M.G.B. Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.12, n.1, p.151-156, 2012.

PERES, L.E.P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25, p. 44-48, mar/abr 2002

PFLUGER, J.; ZAMBRYSKI, P.C. Cell growth: the power of symplastic isolation. **Current Biology**, 11: R436-R439, 2001.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 169 p. 2002.

PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p. 55-65, 2001.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. 1987. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**. v. 138, n. 2-3, p. 89-97, Jun.1987.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2001. A composição molecular das células vegetais. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 17-39, 2001.

RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.2, p.190-195, 2009.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A.; ILKIUBORGES, F.; GURGEL, E.S.C. Anatomia e histoquímica das folhas de *Senna alata*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 515-526, 2009.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; DA SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M. DOS SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 1-6, 2005.

SANTOS, A. C. P. **Embriogênese somática indireta em genótipos de Coffea arabica e de C. canephora**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 90 p. 2002.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R. PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de Segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.3, p.571-577, Maio/Jun., 2003.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n.1, p. 22-29, jan./mar., 2008.

SANTOS, D. N.; NUNES, C.F.; SOARES, J. D. R.; VALENTE, T. C. T.; ALVES, E. ; LABORY, C. R. G.; PASQUAL, M. Cytological characterization of *Jatropha curcas* callus in different periods of cultivation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 228-233, 2013.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C.,v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SILVA, L. C. ; PAIVA, R. ; SILVA, D. P. C.; BARBOSA, S. ; NOGUEIRA, R.C. ; DAVIDE, L. C.; PAIVA, P. D. O. Characterization of Pro-embryogenic Calli and Somatic Embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Agricultural Science and Technology** (USA), v. 2, p. 962-970, 2012.

SILVA, L. C.; PAIVA, R ; VARGAS, D. P. ; SILVA, D.P.C.; HERRERA, R. C.; BARBOSA, S.; COSTA NETTO, A.P. Cell viability of *Byrsonima intermedia* A. Juss Calli. **Journal of Agricultural Science and Technology** (USA), v. 2, p. 713-720, 2012.

SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim Biotecnology**, p.32-40, 2001.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, Jul./Ago., 2007.

STEIN, V.C.; PAIVA, R.; HERRERA, R.C.; VARGAS, D.P. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.53, n.2, p.159-163, jul/dez 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 719 p. 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 509 p.

TORRES, L.F. **Avaliação do potencial embriogênicos de suspensões celulares de *Coffea arabica***. 2013. 111f. Dissertação mestrado em Biotecnologia vegetal, área de concentração em Biologia Molecular – Universidade Federal de Lavras.

TREVIZAM, R.; BRONDANI, G.E.; NERY, F. U.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, Abr./Jun. 2011.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**. v 46, p. 2035-2041, 2008.

VALLE, R.C.S. C.; OCHNER, G.; DEBIASI, C.; FURIGO JÚNIOR, A.; TAVARES, L. Benathar Ballod . Performance of *Piper hispidinervium* cells in submerged system. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 43-51, 2006.

VASCONCELOS FILHO, S.C. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici [*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. Ex ss]**. 2009. 82f. Dissertação mestrado em Botânica – universidade Federal de Viçosa.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.1, p. 13-36, 2000.