

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CULTURA DE TECIDOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE Cyphomandra betacea (Cav.) Sendtn.

VALQUIRIA DE LIMA TAVARES

CAXIAS DO SUL

2009

VALQUIRIA DE LIMA TAVARES

CULTURA DE TECIDOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendtn.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias dos Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

CAXIAS DO SUL

2009

Dedico

Ao **Evaldo**, esposo querido, companheiro e amigo.

Hoje, estou erguendo as mãos para o céu!

Muito Obrigada! Amo você!

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais uma etapa quero dizer, OBRIGADA:

- À Deus, pela vida e por estar presente em todos os momentos.
- Aos sogros, Eodicino (Nono) e Teresinha (Mama) Rossa, pelo carinho, alegria e companhia, adoro vocês.
- Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray pela confiança e orientação para a execução deste mestrado.
- À Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha “*Solanum*”, pela orientação, auxílio, incentivo e paciência no desenvolvimento deste trabalho. Que mesmo tendo todas as atribuições de seu trabalho e conclusão do doutorado, sempre tinha tempo para tudo!
- À Universidade de Caxias do Sul pela estrutura e pelo desconto na mensalidade, antes de ganhar a bolsa, e ao Conselho de Aperfeiçoamento de Profissionais de Ensino Superior (CAPES), pelos sete meses de bolsa concedidos.
- À todos os colegas e professores dos laboratórios do Instituto de Biotecnologia (INBI), pela estrutura e parceria. Em especial, as professoras Mirian Salvador e Adriana Gower pela banca de acompanhamento deste trabalho.
- Ao Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, a professora Mirian Salvador pelo acolhimento e parceria de trabalho, e também a Patrícia Spada, Letícia (Leti) e Bárbara e aos demais componentes deste grupo de pesquisas pelo auxílio e apoio nos experimentos realizados.

- Ao PPGBIO, em especial ao professor Aldo Dillon e as funcionárias Lucimara Serafini e a Rose (da biblioteca).
- As minhas parceiras e amigas da Cultura de Tecidos: Morgana Isotton, Débora Montezano, em especial à Marina Felippi e Luciana Andrade Touguinha.
- À Stela Mari Rossa e Agenor Grandi, pelo apoio e oportunidade de trabalho nas horas difíceis.
- À Dona Ida Benvenuti, pelos conselhos e exemplo de vida.
- A minha “mãezinha” Herondina Castilhos, pelo carinho que sempre me dedicou sem pedir nada em troca.
- Aos amigos, Paulo Sidinei e Margarete Castilhos e a Marines Ribeiro, pelo apoio, por acreditarem e confiarem em mim sendo fiadores do FIES da graduação, sem este não haveria mestrado, obrigada!
- Aos irmãos do Fraterno Coração, especialmente à Fátima Festugato, e aos colegas de grupo da segunda-feira, Horandina, Elisandra, Nilson e Abhay.
- Aos amigos que fiz no laboratório, em especial: Lélis, Manuela Figueró, Roberta Basso, Fernanda Cattani, Camila Miguel, Cléo e a todos os atuais colegas do LBVEMA.
- Aos amigos que me acompanham, uns anteriormente a graduação, outros mais recentemente, que moram no meu coração, Isabel Cristina de Castilhos, Renata Pereira e família, Elisângela dos Santos, Artur Neto, Paula Demeda, Ana Paula da Silva e Ademir, Evandro e Juliana Pessoa, Adelmo e Tânia Bernardi, Henrique, Mari e Duda, Odilon e Val, Sidnei, Ivolete e Lucas, por tudo, pelos exemplos, palavras de apoio e carinho.
- Aos meus bichos- Felinos: Mima, Lelo e o Mimi e Caninos: Brutus, Duque e Barão, chegar em casa e encontrar eles é sempre uma festa, não há tristeza que resista.
- E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Características Botânicas e Agronômicas de <i>Cyphomandra betacea</i>	3
2.1.1. Ecologia e Fitogeografia de <i>Cyphomandra betacea</i>	6
2.1.2. Características gerais dos frutos e folhas de <i>C. betacea</i>	9
2.2. Metabolismo secundário em plantas.....	12
2.3. Micropropagação e Cultura de Tecidos.....	15
2.3.1. Aspectos Gerais da Cultura de Tecidos Vegetais.....	15
2.3.2. Cultura de tecidos em <i>C. betacea</i>	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Material vegetal.....	23
4.2. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	23
4.3. Germinação de sementes <i>in vitro</i>	24
4.4. Ensaio de avaliação do efeito de concentrações de benziladenina e ácido indolacético na micropropagação de <i>C. betacea</i>	25
4.5. Indução de calos e organogênese a partir de explantes cotiledonares e de hipocótilos de <i>C. betacea</i>	25
4.6. Calogênese e organogênese indireta a partir de segmentos foliares e caulinares de <i>C. betacea</i>	26
4.7. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de suco de frutos e extratos foliares de <i>C. betacea</i>	27
4.8 Efeito de reguladores de crescimento na atividade antioxidante e conteúdo fenólico de extratos foliares de <i>C. betacea</i> obtidos <i>in vitro</i>	28

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Efeito das concentrações de benziladenina e ácido indolacético na micropropagação de <i>C. betacea</i>	30
5.2. Indução de calos e organogênese a partir de explantes cotiledonares e de hipocótilos de <i>C. betacea</i>	35
5.3. Calogênese e organogênese indireta a partir de segmentos foliares e caulinares de <i>C. betacea</i>	40
5.4. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de suco de frutos e extratos foliares de <i>C. betacea</i>	46
5.5. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação <i>in vitro</i> , atividade antioxidante e conteúdo fenólico de extratos foliares de <i>C. betacea</i>	47
6. CONCLUSÕES.....	52
7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes e exemplos de metabólitos secundários	13
Tabela 2. Experimentos 1 e 2 com diferentes concentrações de BA e AIA.	25
Tabela 3. Porcentagem de explantes de hipocótilo com regeneração, folhas e raízes na presença de distintas concentrações de BA e Cin.	37
Tabela 4. Porcentagem de explantes com oxidação parcial ou total em distintas concentrações de BA e Cin.....	38
Tabela 5. Atividade antioxidante de sucos de frutos e extratos foliares de <i>C. betacea in vivo</i>	47
Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante e determinação de polifenóis extrato de folha de plântulas micropropagadas tratadas com reguladores de crescimento (BA e AIA).	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>C. betacea</i> , a) planta jovem; b) planta adulta com frutificação; c) detalhe das flores; d) flores e início da formação dos frutos.	5
Figura 2. Variabilidade dos frutos quanto à coloração da pele, mesocarpo, e mucilagem que envolve as sementes de <i>C. betacea</i>	6
Figura 3. Mapa de distribuição geográfica de <i>C. betacea</i> , indicando a sua origem e os lugares onde foi introduzida como planta exótica.	7
Figura 4. Presença de tricomas nas folhas de <i>C. betacea</i> . a) superfície adaxial; b) superfície abaxial; c e d) tricomas simples e glandulares; e) estruturas do tricoma glandular, visualizados na lupa eletrônica.	12
Figura 5. Principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários.	14
Figura 6. Efeito da concentração de BA e AIA na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i>	31
Figura 7. Efeito de reguladores de crescimento sobre o enraizamento <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i>	32
Figura 8. Efeito da adição de baixas concentrações de BA e AIA na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i>	33
Figura 9. Efeito da adição de baixas concentrações de BA e AIA no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i>	34
Figura 10. Aspecto geral de plântulas <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i> em diferentes combinações de BA e AIA.	34

Figura 11. Calogênese em explantes de hipocótilos (a) e cotiledonares (b) na presença de distintas concentrações de BA e Cin.	36
Figura 12. Regeneração de plantas a partir de calos obtidos em meio MS sem reguladores e transferidos para meio MS com 0,5 mg/L de BA.....	39
Figura 13. Aspecto dos calos formados a partir de explantes foliares de <i>C. betacea</i> em meio MS. Tratamentos: a) sem reguladores; b) 1 mg/L 2,4-D; c) 2 mg/L picloram; d) 2 mg/L PDU; e) 0,5 mg/L 4-CPA; f) 2 mg/L ANA; g) 1,5 mg/L PG.	41
Figura 14. Efeito de 2,4-D, picloram, ANA e 4-CPA sobre a calogênese em explantes foliares de <i>C. betacea</i>	42
Figura 15. Aspecto dos calos formados a partir de explantes caulinares de <i>C. betacea</i> em meio MS. Tratamentos: a) sem reguladores; b) 2 mg/L 2,4-D; c) 1,5 mg/L picloram; d) 1 mg/L 2,4-D; e) 0,5 mg/L 4-CPA; f) 1,5 mg/L ANA; g) 2 mg/L PG; h) 2 mg/L PDU.	43
Figura 16. Efeito de 2,4-D, picloram, ANA e 4-CPA sobre a calogênese em explantes caulinares de <i>C. betacea</i>	44
Figura 17. Efeito de reguladores (BA e AIA) na indução da parte aérea de <i>C. betacea</i>	48
Figura 18. Efeito de reguladores de crescimento (BA e AIA) sobre o enraizamento <i>in vitro</i> de <i>C. betacea</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS

1. BA- benziladenina;
2. AIA- ácido indolacético;
3. 2,4-D- ácido 2,4 diclorofenoxiacético;
4. ANA- ácido naftalenoacético;
5. Cin- cinetina;
6. PG- floroglucinol;
7. PDU- N.N'-difenilurea;
8. 4 CPA- ácido-4-clorofenoxiacético;
9. MS- meio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962);
10. DPPH• - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil;
11. CAT- catalase;
12. SOD- superóxido dismutase.

RESUMO

Cyphomandra betacea, popularmente conhecida como tomate árvore ou tamarillo, é uma planta de origem andina da família Solanaceae, com alto potencial econômico como frutífera. A propagação desta espécie ocorre principalmente através de sementes, o que eleva a variabilidade genética, prejudicando a produção de mudas para cultivo em larga escala. Uma alternativa para a produção de mudas é a propagação *in vitro*. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento *in vitro* de diferentes explantes de *C. betacea* frente a reguladores de crescimento, assim como determinar a atividade antioxidante e conteúdo fenólico em folhas, frutos *in vivo* e folhas de plantas micropropagadas de tamarillo. Os resultados obtidos mostram que a micropropagação por subdivisão de segmentos nodais em meio MS sem reguladores de crescimento, é uma alternativa viável para a obtenção de plantas uniformes a partir de explantes oriundos de plantas selecionadas. Regeneração direta foi obtida através do cultivo de segmentos de hipocótilos em meio MS contendo 0,5 mg/L de BA, servindo como alternativa de propagação. Auxinas como 2,4-D, picloram e ANA induziram a formação de calos em explantes foliares e caulinares de *C. betacea*. Entretanto, a elevada oxidação fenólica de explantes e calos impediu a regeneração indireta de plantas a partir destes calos. Por outro lado, regeneração indireta por organogênese foi obtida de calos formados na ausência de reguladores quando transferidos para meio MS com 0,5 mg/L de BA. Extratos foliares de *C. betacea* apresentaram maior atividade antioxidante do que os sucos de frutos maduros e imaturos. Reguladores de crescimento influenciam a atividade antioxidante, de folhas de plântulas *in vitro*. Tratamentos com BA induzem um aumento no teor de polifenóis totais e na atividade antioxidante *in vitro*.

ABSTRACT

Cyphomandra betacea, popularly known as “tomate árvore” or “tamarillo”, is an Andean species of the *Solanaceae* family with high economic potential as fruit crop. The propagation of this specie is made by seeds, a system that provoke undesirable variations in fruit shape, color, plant behavior and yield, among other traits. An alternative for the production of *C. betacea* is *in vitro* propagation. In this context, the aims of the present work were to evaluate the *in vitro* response of different explants of *C. betacea* to growth regulators, as well as the determination of the antioxidant activity and phenolic content of leaves, fruits and micropropagated plants of tamarillo. The results obtained showed that micropropagation by division of nodal segments and their culture on MS medium without growth regulators, is a feasible alternative for the production of uniform propagules from selected plants. Direct regeneration was obtained from hypocotiles segments cultivated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L of BA, representing an alternative for *C. betacea* propagation. Auxins, as 2,4-D, picloram and NAA, induced callus formation from leaves and stem explants of *C. betacea*. However, high phenolic oxidation of both explants and calli prevented the indirect regeneration from those calli. However, indirect organogenic regeneration was obtained from stem derived calli developed in the absence of growth regulators, when transferred to MS medium with 0.5 mg/L of BA. Leaf extracts of *C. betacea* exhibited higher antioxidant activity than the juice obtained from mature and immature fruits. *In vitro* growth on BA containing media duplicated the phenolic content and the DPPH free radical scavenging proprierty, and significantly reduced the CAT-like activity.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o mercado mundial, tanto produtor quanto consumidor, busca alternativas para novas fontes de alimentos, assim como compostos que sirvam de matéria-prima para a indústria alimentícia e farmacêutica, preocupando-se com um menor impacto sobre o meio ambiente e garantindo o desenvolvimento sustentável do planeta.

O consumo de alimentos exóticos, tem como características principais a inovação e a busca por propriedades nutricionais e funcionais para a saúde. Neste sentido, essas espécies vegetais vêm despertando a atenção de produtores e pesquisadores em todo o mundo. A *Cyphomandra betacea* apresenta-se como uma das opções. Conhecida no Brasil como tomate japonês, tomate árvore ou tamarillo, pertence à família Solanaceae, a qual possui representantes de grande relevância, como o tomate, batata, berinjela entre outros. As solanáceas são fontes não somente de alimentos, mas também de compostos de interesse farmacêutico, como alcalóides esteroidais e compostos fenólicos.

A *C. betacea*, planta de origem Andina, é atualmente cultivada nos trópicos Asiáticos, Nova Zelândia e região dos Andes da América do Sul. No Brasil, passa por uma fase de transição, que vai desde a produção em jardins ou em pequenos cultivos caseiros em vários estados, até produções em maior escala, como tem sido visto no estado de São Paulo.

Os frutos desta espécie apresentam grande potencial para consumo *in natura*, além de características organolépticas interessantes e quantidades importantes de vitaminas, ferro, potássio, magnésio e fósforo, assim como, atividade antioxidante.

O interesse no consumo dos frutos de *C. betacea* leva ao aumento dos estudos sobre o cultivo e o melhoramento da espécie. Planta arbustiva, o tamarillo se propaga principalmente através de sementes, fato este que leva esta espécie a apresentar elevada variação genética e conseqüentemente, variabilidade na composição química, características fenotípicas e agronômicas.

A propagação vegetativa através de estacas é uma ferramenta que tem sido utilizada para esta espécie no sentido de aumentar a uniformidade genética e fenotípica. Entretanto, esta técnica traz a possibilidade de propagação de doenças, além de limitar o número de mudas obtidas por unidade de tempo. Entre as alternativas de propagação vegetativa, a propagação *in vitro* pode ser apontada como uma prática eficiente. Além da propagação em si, a cultura de tecidos vegetais permite o estudo do metabolismo secundário, da influência dos reguladores de crescimento, entre outros aspectos da fisiologia vegetal.

Dessa maneira, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento e explantes na indução de calos e regeneração de plantas para produção em larga escala de mudas de *C. betacea*, bem como analisar a atividade antioxidante e quantificar conteúdo fenólico em folhas *in vivo*, frutos e folhas de plântulas micropropagadas de *C. betacea*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características Botânicas e Agronômicas de *Cyphomandra betacea*

C. betacea (Cav.) Sendtn é uma espécie pertencente a família Solanaceae, apresentando as seguintes sinonímias: *Cyphomandra betacea* (Cav.) Emta, *C. crassifolia* (Ortega) Kuntze, *Solanum crassifolium* Ortega, *Solanum betacea* ou *betaceum* (Cav), (Bohs, 1989) além de inúmeros nomes populares. No Brasil é conhecida como tamarillo, tomate árvore, tomate chimango, tomate francês, tomate da serra, entre outros (Bohs, 1989).

A família Solanaceae é constituída por cerca de 106 gêneros e 2300 espécies, apresentando distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros de diversidade e endemismo (Agra *et al.*, 2009). Atualmente, os estudos moleculares na família Solanaceae e gênero *Solanum* tem se intensificado, como consequência, as posições intergenéricas de alguns táxons estão sendo alteradas, como por exemplo a inclusão de *Lycopersicum* e *Cyphomandra* no gênero *Solanum*. Estes estudos têm proporcionado uma visão mais detalhada da filogenia da família, e contribuído para elaborar uma hipótese filogenética mais abrangente para o gênero *Solanum* (Bohs, 1989; Árias, 2006; Soares & Mentz, 2006; Agra *et al.*, 2009)

Em relação a *C. betacea*, estudos tem mostrado que a nomenclatura e taxonomia dessa espécie passa por uma fase de transição. Estudos publicados sobre essa planta a classificam com as duas nomenclaturas, tanto *Cyphomandra* (Mwithiga *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2007; Gordon *et al.*,

2007; De Rosso & Mercadante, 2007; Vasco *et al.*, 2008; Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008; Sanz-Biset *et al.*, 2009; Stangeland *et al.*, 2009; Kou *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009), quanto *Solanum* (Soares & Mentz, 2006; Osório *et al.*, 2007; Vasco *et al.*, 2009; Mertz *et al.*, 2009a; Mertz *et al.*, 2009b; Hurtado *et al.*, 2009; Sabbe *et al.*, 2009).

Soares e Mentz (2006), em estudos sobre a filogenia da família Solanaceae, baseados em biologia molecular, morfologia e dados de campo propõem a inclusão do gênero *Cyphomandra* Mart. ex Sendtn para o gênero *Solanum* L., concordando com Bohs (1989, 1991, 1994, 1995). Segundo Soares e Mentz (2006), as espécies do gênero *Cyphomandra* no Rio Grande do Sul podem ser classificadas como pertencentes ao gênero *Solanum*, subgênero *Bassovia* seção *Pachyphyla*. Nesta classificação estão três espécies nativas, *Solanum corymbflorum* (Sendtn.) Bohs, *Solanum diploconos* (Mart.) Bohs e *Solanum sciadostylis* (Sendtn.) Bohs e a *Solanum betaceum* (Cav.) Bohs descrita como espécie introduzida.

Plantas de *C. betacea* são descritas por Soares e Mentz (2006) como arbustos ou arvoretas (figura 1a), inermes, com ramos recobertos por tricomas simples, dendríticos e glandulares. As suas folhas são simples, pecioladas e alternas. A lâmina foliar de consistência membranosa e margem inteira ou lobada. As inflorescências são terminais do tipo cima escorpióide, pêndulas, ramificadas ou não. As flores são actinomorfas, monoclinas, pediceladas, com pedicelos articulados. O cálice é pentâmero com lacínias triangulares. A corola é estrelado-rotada, rotada ou campanulada e pentalobada. A flor apresenta cinco estames adnatos próximos à base da corola. As anteras são ventrifixas, elipsóides ou oblongadas, de deiscência poricida, com conetivo expandido, glanduloso, evidente na porção dorsal. O ovário é cônico ou ovóide, bilocular, com inúmeros rudimentos seminais; estilete cilíndrico, reto ou elipsóide, pêndula; cálice frutífero persistente, não acrescente (figura 1). As sementes são achatadas e reniformes. Na chave de classificação, os frutos apenas são descritos por apresentarem cores entre amarelo e laranja quando maduros e a pele lisa.



Figura 1. *C. betacea*: a) planta jovem ; b) planta adulta com frutificação; c) detalhe das flores; d) flores e início da formação dos frutos.

Segundo Bohs (1989), o fruto maduro apresenta muitas sementes, é de forma elíptica, de pele lisa, atingindo de 4 a 10cm de comprimento e 3 a 5cm de largura. As cores dos frutos variam do amarelo ao roxo passando por diferentes tonalidades de laranja e vermelho, apresentando frequentemente listras longitudinais escuras. A pele fina do fruto possui sabor amargo, o mesocarpo é carnoso e sua cor varia do amarelo creme ao laranja claro, variando de sabor suave a amargo, enquanto que a mucilagem que envolve as sementes é doce quando o fruto está maduro (figura 2).

A variabilidade presente em *C. betacea* caracteriza a preferência dos diversos países em que é comercializada. Nos E.U.A., a espécie comercial principal é a que apresenta frutos vermelhos escuro ou roxos e uma camada púrpura ou escura em torno das sementes; já na América do Sul, a maioria dos frutos do tomate árvore comercializados e plantados apresentam a coloração laranja ou laranja avermelhada, com mesocarpo amarelado (Bohs, 1989).



Figura 2. Variabilidade dos frutos quanto à coloração da pele, mesocarpo e mucilagem que envolve as sementes de *C. betacea*.

2.1.1. Ecologia e Fitogeografia de *Cyphomandra betacea*

Do ponto de vista econômico, a *C. betacea* é um dos membros mais importantes do gênero *Cyphomandra*. Este gênero inclui cerca de 50 espécies, distribuídas na América Latina, América Central, Índias Ocidentais e ao longo dos Andes. Nativa dos Andes, a domesticação e cultivo de *C. betacea* ocorreram antes da descoberta da América (Bohs, 1989).

Espécie cultivada mundialmente em regiões subtropicais ou regiões temperadas (figura 3), apresenta dois importantes centros de dispersão: um nas encostas andinas do Peru e Bolívia e outro no sudeste do Brasil (Bohs, 1989). As plantações de *C. betacea* foram estabelecidas em diversos locais na Colômbia, Equador, Haiti e Nova Zelândia (onde recebeu o nome de tamarillo, para diferenciá-lo do tomate). No Brasil, a espécie *C. betacea* é descrita brevemente na flora ilustrada catarinense como possivelmente nativa da Colômbia e da Amazônia brasileira e cultivada em todo o

país (Smith & Downs, 1966). No Rio Grande do Sul, é descrita como uma espécie introduzida de acordo com Soares e Mentz (2006).



Figura 3- Mapa de distribuição geográfica de *C. betacea*, indicando a sua origem e os lugares onde foi introduzida como planta exótica. (adaptado de www.worldagroforestry.org/af/).

Levando em consideração a ecologia e fitogeografia de *C. betacea*, essa espécie apresenta fatores climáticos limitantes para o seu desenvolvimento, sendo caracterizadas como regiões ideais aquelas com temperaturas entre 18 e 22°C, precipitações anuais de 600 a 800 milímetros e altitudes entre 1.500 e 3.000m.

As plantas de tamarillo não toleram geada quando desprotegidas ou em fases iniciais de crescimento (Bohs, 1989). As observações em jardins mostram que as plantas crescem melhor associadas a outras árvores (por exemplo *Erythrina edulis*, *Juglans neotropica*), onde um microclima mais úmido é proporcionado pelas espécies mais altas, com menor desidratação do solo, e onde a luz é difundida (Bohs, 1989). No México, *C. betacea* é cultivada em associação com o café (López-Gómez *et al.*, 2008).

As altas temperaturas e secas prolongadas podem afetar a floração e a frutificação (Bohs, 1989), sendo que a floração da *C. betacea* começa entre oito e dez meses após estar na posição permanente. A floração é contínua e o número de inflorescências é diretamente proporcional aos ramos da planta. A planta *C. betacea* é sempre verde. Entretanto, as folhas mais baixas caem mais tarde, deixando o tronco principal e a parte inferior dos troncos secundários sem folhas (Chilpa & Diago, 1993).

A produção de frutos do *C. betacea* ainda gera contradições entre pesquisadores, sendo descritos períodos de oito à dez anos (Bohs, 1989; Chilpa & Diago, 1993; Robles & Hashimoto, 2006), enquanto outros citam o tempo de três a quatro anos (Aponte *et al.*, 2005). Tal característica do tamarillo, ainda não é definida devido ao fato de sua produção estar muito relacionada com as condições edafoclimáticas do local de cultivo (Bohs, 1989).

O cultivo comercial de *C. betacea* está em ascensão, sendo cultivada comercialmente na Nova Zelândia, e em menor escala no México, Argentina, Peru e Colômbia. Entretanto, o cultivo de tamarillo pode ser desenvolvido em todas as áreas subtropicais e tropicais (Bohs, 1989; Aponte *et al.*, 2005; Árias, 2006; Robles & Hashimoto, 2006). As perspectivas do tamarillo são determinadas pelos alto rendimento por planta (média de 20 kg/ano), qualidade e diversidade do uso de sua fruta, baixo investimento em insumos agrícolas, e ser de relativo fácil manejo agrícola (Bohs, 1989; Aponte *et al.*, 2005; Robles & Hashimoto, 2006) A sua maior importância é atribuída a exploração industrial de seus frutos para utilização em conservas. Esta agroindústria promoveria o aumento do cultivo para áreas maiores e estenderia o mercado (Bohs, 1989; Aponte *et al.*, 2005). Na Venezuela, o cultivo de tamarillo geralmente é realizado como complemento de um cultivo principal, como o de pêssego, morango e hortaliças, em hortas de um quarto a meio hectare (Aponte *et al.*, 2005). Quanto as cultivares, de acordo com Correia *et al.* (2009), a denominação ocorre pela cor dos frutos, como tamarillo amarelo (YT), tamarillo laranja (OT) e para os vermelhos (RTC e RTL). O preço de mercado do tamarillo nacional, segundo dados publicados pelo Jornal Folha de São Paulo

(11/04/2008), é de R\$ 17,00/Kg para o tamarillo variedade vermelho e R\$ 14,00/Kg para o tamarillo variedade amarelo, sendo que o fruto importado vem sendo comercializado a R\$ 67,00/Kg.

Os frutos apresentam propriedades nutricionais relevantes para a dieta humana. Podendo ser degustados *in natura*, diretamente, em saladas, em sucos ou cozidos em doces (geléias, compotas) tortas e também em salgados, como molhos associados a carnes (Chilpa & Diago, 1993; Aponte *et al.*, 2005).

2.1.2. Características gerais dos frutos e folhas de *C. betacea*

Estudos químicos de frutos frescos de *C. betacea* indicam que ele é fonte importante de pró-vitamina A, vitamina B6, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E e ferro. Também possui conteúdos elevados de potássio, magnésio, fósforo, assim como pectinas e aminoácidos livres. O tamarillo possui baixos índices de carboidratos, apresentando menos de 40 calorias por fruto, quando maduro, menos de 1% de amido e 5% de açúcares solúveis, na forma de sacarose, glicose e frutose (Bohs, 1989; Chilpa & Diago, 1993; Robles & Hashimoto, 2006).

Entre os componentes químicos responsáveis pela coloração do fruto do tamarillo destacam-se as antocianinas, leucoantocianinas e flavonóides. O *C. betacea* possui alcalóides esteroidais do tipo espirosolanos, solasodina e tomatidenol, sendo que dentre estes a maior atenção tem sido dada aos alcalóides esteroidais como fontes alternativas, na síntese de esteróides de interesse farmacêutico (Bohs, 1989; Chilpa & Diago, 1993; Mentz *et al.*, 2000; Robles & Hashimoto, 2006).

Bobbio *et al.* (1983) identificaram antocianinas de *C. betacea* presentes nas sementes vermelhas escuras e epicarpo marrom avermelhado da fruta. Foram identificados a 3-glicosil-glicose de pelargonidina em epicarpo e sementes. Dois outros pigmentos presentes nas sementes

foram identificados como 3-glicosil-glicose de peonidina e 3-glicosil-glicose de malvidina, esses pigmentos apresentavam um açúcar semelhante a maltose. Estudos realizados por Osório *et al.* (2007) indicam que os frutos vermelhos podem servir como fonte natural de corantes para cosméticos.

Quanto à composição lipídica das sementes de *C. betacea*, sua caracterização físico-química e composição dos ácidos graxos, tanto de variedades vermelhas como amarelas indicam que o óleo extraído pode ser recomendado para saladas e como possível agente nutracêutico (Belén-Camacho *et al.*, 2004).

Três lectinas, proteínas vegetais defensivas, que se ligam a carboidratos ou glicoproteínas inibindo a sua digestão por um herbívoro (Taiz & Zeiger, 2009), foram isoladas do suco de frutos maduros de *C. betacea* (Xu *et al.*, 1992; Sampietro *et al.*, 2001).

Ordoñez *et al.* (2006), por sua vez, avaliaram a atividade antimicrobiana do tamarillo, usando proteínas extraídas dos frutos maduros, sendo isolada e identificada a proteína inibidora da invertase (IIP), a qual apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro, inibindo o crescimento de fungos xilófagos e fitopatogênicos (*Ganoderma applanatum*, *Schizophyllum commune*, *Lenzites elegans*, *Pycnoporus sanguineous*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, *Phomopsis sojae* e *Fusarium mango*) e bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonas campestris* pvar *vesicatoria* CECT 792, *Pseudomonas solanaceaurm* CECT 125, *Pseudomonas corrugata* CECT 124, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *Erwinia carotovora* var. *carotovora*). O potencial exibido pela IIP contra bactérias e fungos sugere que ela tenha importante papel na defesa das plantas contra fitopatógenos. Além disso, a proteína apresenta baixo peso molecular, associado com alto potencial antimicrobiano, tornando-se destaque para exploração de suas atividades biológicas.

O estudo da atividade antioxidante e da constituição química dos frutos de tamarillo, correlacionados com a prevenção de várias doenças crônicas degenerativas destacou-se

recentemente (Gordon *et al.*, 2007; De Rosso & Mercadante, 2007; Osório *et al.*, 2007; Mertz *et al.*, 2009a; Vasco *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2009; Stangeland *et al.*, 2009; Kou *et al.*, 2009).

Além da importância dos frutos da *C. betacea*, o estudo da composição de suas folhas torna-se relevante, já que, estudos etnofarmacobotânicos apontam também sua utilização no tratamento de gripe, inflamações das amídalas, angina, abscessos e tosse (Chilpa & Diago, 1993; Robles & Hashimoto, 2006; Sanz-Biset *et al.*, 2009). Entretanto, a composição química e as propriedades farmacológicas de extratos de folhas não têm sido estudadas.

Uma das características dos membros da família Solanaceae é a de apresentar na sua estrutura externa a presença de tricomas, cujas estruturas são de grande importância para a classificação botânica (taxonomia), além de armazenarem substâncias derivadas do metabolismo secundário como compostos fenólicos, taninos entre outros. A maioria das espécies do gênero *Solanum* possuem tricomas nos caules, folhas e inflorescências (Mentz *et al.*, 2000).

Os tricomas simples ocorrem em quase todas as espécies do gênero *Solanum*. São classificados nesse grupo os tricomas unicelulares, não glandulares, e os pluricelulares unisseriados e não ramificados. Já os tricomas complexos se aplicam aos tricomas glandulares que apresentam a célula apical ou células apicais arredondadas, de conteúdo citoplasmático denso, modificadas para secreção ou acumulação. Este tipo de tricoma é formado por três partes: a porção imersa na epiderme, a porção proximal, que é forma o pedicelo, e a porção distal, clavada ou globosa, que é secretora (cabeça), (Mentz *et al.*, 2000) tal tipo de tricoma ocorre em *C. betacea* (figura 4).

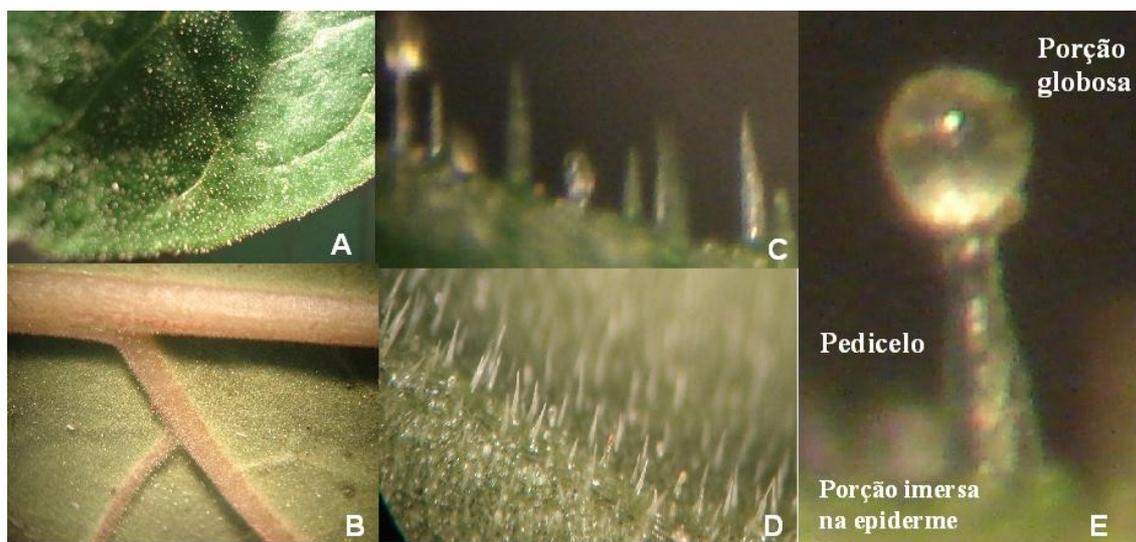


Figura 4. Presença de tricomas nas folhas de *C. betacea*: a) superfície adaxial; b) superfície abaxial; c e d) tricomas simples e glandulares; e) estruturas do tricoma glandular, visualizados na lupa eletrônica.

2.2. Metabolismo secundário em plantas

As plantas produzem uma ampla gama de compostos orgânicos conhecidos como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários não apresentam ação direta no crescimento, constituição e desenvolvimento quando comparadas as substâncias do metabolismo primário, porém as mesmas são essenciais na garantia de sobrevivência e perpetuação das espécies, conferindo proteção contra herbívoros, patógenos e auxiliando na dispersão de pólen e sementes.

Presentes em concentrações em geral inferiores aos metabólitos primários, os metabólitos secundários incluem uma série de compostos que podem ser classificados de acordo com suas similaridades estruturais, vias biossintéticas ou tipo de plantas onde estão presentes. Segundo Craik *et al.* (2002) podemos dividir os metabólitos secundários em três grandes classes, baseados na via biossintética: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (tabela 1).

Tabela 1. Classes e exemplos de metabólitos secundários (Adaptado Craik *et al.*, 2002)

Classes/subclasses	Tipo de Composto	Exemplos
Terpenóides		
Monoterpenóides	Monoterpeno Lactonas	Nepetolactonas
Sesquiterpenóides	Sesquiterpeno lactonas	Artemisininas
Diterpenóides	Giberelinas	Ácido Giberélico
Triterpenóides	Saponinas	Diosgenina
	Esteróides	Sitosoterol
Tetraterpenóides	Carotenóides	Licopeno
Terpenóides Ésteres	Piretróides	Piretrina
Compostos Fenólicos		
Fenóis	Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Cafêico
Fenilpropanóides	Hidroxicumarinas	Umbeliferona
	Fenilpropanóides	Eugenol
	Lignanos	Pinoresinol
Flavonóides	Antocianinas	Cianidina
	Flavonóides	Caenferol
	Flavonas	Luteolina
	Glicoflavonas	Orientina
Compostos Nitrogenados		
Alcalóides	Benzilisoquinolinas	Morfina
	Bisindole	Vincristina
	Diterpenóides	Aconitina
	Indóis	Serpentina
	Indolizidinas	Inosina
	Piridinas	Nicotina
	Pirrolizidinas	Senecionina
	Esteroidais	Solanina
	Tropanos	Atropina
	Quinolinas	Quinina
	Quinolizidinas	Anagirina
		Canavanina
	Aminoácidos Tóxicos	Prumasin
Glicosídeos Cianogênicos	Glucocaparina	
Glucosinolatos	Piperícida	
Amidas	Mescalina	
Amidas Aromáticas		

O balanço entre as atividades do metabolismo primário e secundário é considerado dinâmico, fato esse que pode ser analisado observando-se o próprio ciclo biossintético dos metabólitos secundários (figura 5) em que alterações no primário podem afetar profundamente o secundário e, embora o reverso não seja considerado totalmente verdadeiro; em alguns casos os metabólitos secundários são convertidos em primários.

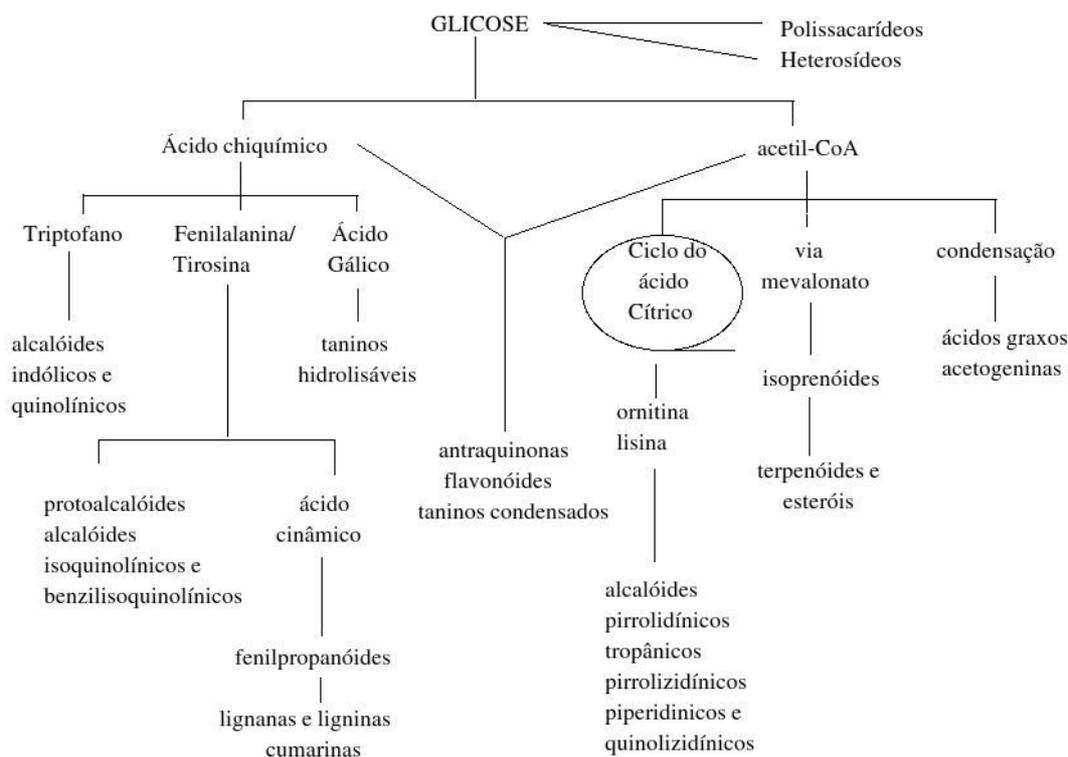


Figura 5: Principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários (Simões *et al.*, 2004).

Os estudos relacionados a metabólitos secundários em plantas aumentaram significativamente nos últimos 50 anos. As moléculas oriundas do metabolismo secundário são conhecidas como sendo o maior modelo na adaptação de plantas para seu ambiente, mas também representam uma importante fonte de compostos bioativos de potencial aplicação farmacêutica (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

As plantas medicinais são, na sua maioria, fontes exclusivas de importantes compostos medicinais ou de valor industrial para grande parte da população mundial. Compostos bioativos atualmente extraídos de plantas são utilizados como aditivos de alimentos, pigmentos, corantes, inseticidas, cosméticos, perfumes e química fina (Balandrin & Klocke, 1988).

Levando em consideração a descoberta de diferentes compostos derivados de plantas, Verpoorte (1998) estimou a quantia de 100.000 compostos e em torno de 4.000 novos compostos sendo descobertos a cada ano. Cerca de 40% ou mais dos medicamentos comumente utilizados nos países ocidentais são de derivados de plantas (Rout *et al.*, 2000). O mercado de fitofármacos e fitoterápicos, segundo Tyler (1994), é da ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, sendo que mais de 13.000 plantas são mundialmente usadas como fonte de fármacos.

2.3. Micropropagação e Cultura de Tecidos

2.3.1. Aspectos Gerais da Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos tem como definição básica o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta, constituído por frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em meio de cultura, sob condições controladas de umidade, temperatura e luminosidade, para gerar uma nova planta. Esta técnica baseia-se principalmente, na capacidade de células vegetais originarem novas células, e se diferenciarem em tecidos e órgãos, originando uma nova planta. Tal propriedade é dita totipotência (Grattapaglia & Machado, 1998).

As técnicas de micropropagação e cultura de tecidos são formas de propagação e manutenção do material vegetal utilizados para espécies que normalmente se reproduzem vegetativamente, assim como para outras espécies onde esse tipo de reprodução é difícil. Como principais vantagens associadas a essa técnica podemos citar: 1) capacidade de cultivo de partes de plantas muito pequenas (explantes) como gemas, meristemas ou embriões como ponto de partida para propagação vegetativa de uma espécie vegetal; 2) propagação em condições assépticas, aumentando o grau de sanidade do material vegetal; 3) material vegetal livre de vírus; 4)

manutenção de grandes quantidades de material vegetal em espaço e tempo reduzidos independente das condições edafoclimáticas (George, 1996).

Existem mais de 50 formulações de meio de cultivo utilizados nas mais diferentes espécies para a cultura de tecidos vegetais (Rout *et al.*, 2000), no entanto o meio de cultivo mais utilizado em todo o mundo é o meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

Basicamente, um meio de cultivo para plantas tem como requerimentos fundamentais fonte de macronutrientes, entre eles N, P, K, Ca, Mg e S, micronutrientes incluindo Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo e Ni além de vitaminas como a Tiamina (B1), Ácido Nicotínico (B3), Piridoxina (B6), mio-inositol e fontes de carbono como a sacarose normalmente presente na concentração de 2 a 3% sendo a mais utilizada, assim como o uso de agentes geleificantes requeridos na maioria dos cultivos *in vitro*, sendo o ágar o mais utilizado.

A escolha do tipo de explante para introdução de um cultivo *in vitro* é considerado fator decisivo, levando em conta o nível de diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação. Em geral, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado, 1998).

De acordo com Torres *et al.* (1998), ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados para a propagação clonal, os quais possuem determinação para o crescimento vegetativo. A organogênese direta (regeneração de plantas a partir de tecidos não-meristemáticos, sem a passagem pela fase de calo) é observada em diversas espécies, onde utilizam-se como explantes iniciais discos foliares e internós. A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calos. A partir de células não organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. Também se destacam para serem utilizados como explantes, os hipocótilos e cotilédones, visto a sua origem embrionária, apresentando potencial para diferenciação por serem oriundos de sementes recém germinadas.

O uso de reguladores ou hormônios de crescimento combinados ou não entre si no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos (Torres *et al.*, 1998).

De um modo geral, em cultivos *in vitro*, as citocininas são utilizadas para estimular o desenvolvimento da parte aérea e as auxinas para promover o desenvolvimento radicular, a formação de calos e a embriogênese somática. Entretanto, a resposta aos reguladores de crescimento é altamente variada dependendo da espécie vegetal, do explante, do estado fisiológico e da cultivar (Torres *et al.*, 1998).

Interações entre essas duas classes de reguladores são consideradas complexas, e mais de uma combinação de substâncias tem apresentado ótimos resultados. Auxinas e citocininas são frequentemente utilizadas para crescimento ou morfogênese, sendo que auxinas podem inibir o acúmulo de citocininas (Hansen *et al.*, 1985), embora citocininas possam inibir também algumas ações das auxinas (George, 1996).

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (Santiago, 2001). Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais utilizadas em cultura de tecidos são BA (benziladenina), Cin (cinetina ou 6-furfurilaminopurina), 2ip (2-isopenteniladenina), Zea (zeatina) e TDZ (tidiazuron), e em menor proporção, DPU (N,N' difenilurea).

As auxinas por outro lado, apresentam uma importância fundamental no crescimento e desenvolvimento dos vegetais. São determinantes nos processos de expansão e alongamento celular, nos movimentos trópicos (fototropismos, gravitropismo e tigmotropismo), na divisão das células, na diferenciação vascular, na dominância apical, no alongamento do caule, no desenvolvimento do embrião, na cicatrização de lesões e na senescência e abscisão (Taiz & Zeiger, 2009). No cultivo *in vitro*, as concentrações de auxinas podem variar de 0,01 a 10 mg/L. As auxinas mais utilizadas são

AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenoacético), 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e picloran. A auxina 2,4-D é preferencialmente utilizada para a indução de calos e tem o efeito de supressão da morfogênese. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o picloran induzem a formação de calos em monocotiledôneas (Ammirato, 1983).

Alguns compostos fenólicos são utilizados no cultivo *in vitro*, como potencializadores de auxinas, como por exemplo o floroglucinol (1,3,5-hidroxibenzeno), o qual induziu crescimento em considerável número de explantes, independentemente de sua capacidade de responder à auxina endógena em macieiras. Rufato *et al.* (1999).

A utilização de técnicas de cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta de auxílio ao melhoramento genético de fruteiras. O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como principais reguladores da morfogênese *in vitro*. Dentre as citocininas, BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação da parte aérea e a indução de gemas adventícias (Grattapaglia & Machado, 1998).

2.3.2. Cultura de tecidos em *C. betacea*

A propagação tradicional de *C. betacea* é comumente realizada através de sementes ou estacas (Prohens & Nuez, 2001). Sementes germinam facilmente, sendo utilizadas para originar novas cultivares (Slack, 1976), enquanto índices de incompatibilidade e problemas fitossanitários tem limitado a propagação por estaca para essa espécie.

A falta de materiais geneticamente uniformes prejudica a utilização do *C. betacea*, já que os extratos dos frutos podem variar significativamente dependendo do genótipo da planta do qual

foram extraídos. Este fato pode ser solucionado através da propagação clonal de genótipos superiores, previamente selecionados. Nesse sentido, a micropropagação de *C. betacea* apresenta-se como uma importante ferramenta para a propagação e melhoramento dessa espécie.

Pesquisas utilizando técnicas de cultivo *in vitro* em *C. betacea* tem sido alvo de estudo de diversos pesquisadores, sendo relatados estudos de micropropagação (Cohen & Elliot, 1979; Barghchi, 1986; Obando *et al.*, 1992; Osório, 1992; Gatita & Almeida, 2003), regeneração direta (Obando & Jordan, 2001, Jordan *et al.*, 1993), transformação genética (Atkinson & Gardner, 1993), limpeza viral (Barghchi, 1998) e embriogênese somática (Gatita & Almeida, 2003; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009).

Inúmeras estratégias de propagação *in vitro* de *C. betacea* tem sido utilizadas na busca da otimização do cultivo dessa espécie. Hoyos e Kafuri (1998), em ensaios visando a micropropagação de *C. betacea*, a partir de internós com uma gema, relataram ser o meio de cultivo MS acrescido de 0,1 mg/L de AIA o tratamento ideal para propagação de tamarillo. Por outro lado, Gatita e Almeida (2003), utilizando como explantes cotilédones inteiros e hipocótilos e como reguladores de crescimento BA (2-5 mg/L), AIA (0,5-1 mg/L) e Zeatina (1-2 mg/L), obtiveram os melhores resultados de organogênese direta com a combinação de 2 mg/L de BA e 0,5 mg/L de AIA assim como 2 mg/L de Zeatina.

Obando e Jordan (2001) utilizando cotilédones, pecíolos e ovários induziram inicialmente calos e após brotos em presença de TDZ sozinho ou combinado com AIA, apresentando de 2,1 a 16,3 brotos adventícios por explante. Guimarães *et al.* (1988), afirmaram haver obtido cultura de calos com estruturas poliembriogênicas globulares, induzidas em segmentos de hipocótilos ou embriões de *C. betacea* em presença de 2,4-D, constatando que as plantas regeneradas dessas estruturas poliembriogênicas foram todas $2n=24$. Esses resultados concordam com Lopes *et al.* (2000) e Maia (2002) onde calos originários de embriões zigóticos, explantes foliares de plântulas ou gemas também foram induzidos em presença de 2,4-D ou picloram embora análises utilizando

RAPD mostraram polimorfismos nos calos embriogênicos mantidos por períodos de mais de um ano (Lopes *et al.*, 2000).

Canhoto *et al.* (2005), utilizando diferentes tipos de explantes, como folhas jovens, embriões zigóticos e internós, e diferentes meios de cultivo obtiveram indução de calos embriogênicos, em tamarillo, avaliando também possíveis variações somaclonais herdáveis nessa cultura.

A variação somaclonal presente na organogênese indireta, permite a obtenção de aumento da variabilidade genética e a transmissão das características herdáveis, apresentando-se como a soma de variações (mutações cromossômicas e gênicas) que são incorporadas nas plantas regeneradas de uma espécie (Torres *et al.*, 1998).

No caso do tamarillo, a variação somaclonal seria uma desvantagem, enquanto se procura obter linhagem uniforme para cultivo em larga escala, porém ela pode auxiliar na seleção e no desenvolvimento de novos cultivares, melhorando esta espécie, bem como, linhagens com características químicas de interesse à indústria alimentícia, química e farmacêutica.

Visando uma maior estabilidade genética, estudos em embriogênese somática, tem sido realizados na busca de diferentes respostas morfogênicas *in vitro*. Guimarães *et al.* (1988) relataram pela primeira vez o êxito na indução da embriogênese somática em tamarillo por meio de cultivo de embriões zigóticos maduros e hipocótilos de plântulas. Lopes *et al.* (2000) posteriormente descreveram a regeneração de plantas de tamarillo por organogênese e embriogênese somática utilizando diferentes tipos de explantes, entre eles o uso de protoplastos. No entanto Lentini (2002) em busca de um protocolo de regeneração via organogênese ou embriogênese somática estudando Lulo (*Solanum quitoense*) e Tamarillo (*C. betacea*) afirma não obter êxito para *C. betacea* testando os protocolos já descritos na literatura para essa espécie.

O uso de diferentes reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* tem servido como alternativa a propagação de diferentes espécies vegetais como o PG (floroglucinol), PDU (N,N'difenilurea) e 4-CPA (ácido-4-clorofenoxiacético). Até o presente momento, não foi avaliado o

uso desses reguladores em *C. betacea*, sendo já relatado para o cultivo *in vitro* de espécies como *Solanum tuberosum*, (Sarkar & Naik, 2000), *Mallus domestica* (Rustaei *et al.*, 2009), entre outras.

O estudo *in vitro* de tamarillo vem aumentando nas últimas décadas, acompanhando as pesquisas que destacam à sua importância química e nutricional. Porém, necessitam-se estudos mais aprofundados devido a grande variabilidade de respostas obtidas a respeito da morfogênese dessa espécie para um melhor uso da cultura de tecidos como real ferramenta que será de grande utilidade para o melhoramento e propagação clonal de *C. betacea*.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento e explantes na indução de calos e regeneração de plantas para produção em larga escala de mudas de *C. betacea*, bem como analisar a atividade antioxidante em folhas, frutos *in vivo* e folhas de plantas micropropagadas de *C. betacea*. Os objetivos específicos deste trabalho são: (1) Avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos, assim como na regeneração direta e indireta de *C. betacea*; (2) Determinar o efeito de tipo de explantes (folhas, pecíolos, cotilédones e hipocótilos) na resposta *in vitro* de *C. betacea*; (3) Avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento BA e AIA na multiplicação *in vitro* de *C. betacea*; (4) Avaliar a atividade antioxidante de extrato de folhas e frutos *in vivo* e de folhas de plântulas micropropagadas sob ação de reguladores de crescimento; (5) Quantificar os polifenóis totais de *C. betacea* em extrato de folhas *in vivo* e folhas de plântulas micropropagadas sob ação de reguladores de crescimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado como matriz para a introdução da planta de *C. betacea in vitro* foi coletado na cidade de Caxias do Sul (Bairro Cruzeiro), sendo identificado e depositado no Herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), sob o número de registro 34439.

4.2. Sistemas de cultivo *in vitro*

Para a realização dos experimentos *in vitro* de *C. betacea* foi utilizado o meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C por 20 min e o pH utilizado foi ajustado a 5,8 com solução de NaOH, previamente à autoclavagem. Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, fotoperíodo de 16/8h com irradiância de 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No caso particular dos experimentos de indução de calos o cultivo foi realizado no escuro a 25±2°C.

Os cultivos foram realizados em tubos de ensaio Sigma® de 20mm x 120mm com 5 mL de meio de cultivo por tubo ou placas de Petri de 9,5cm de diâmetro com 25 mL de meio de cultivo por placa.

Os experimentos foram realizados em blocos casualizados ou em sistemas fatoriais com 20 repetições por tratamento. A avaliação do efeito de BA e AIA na multiplicação foi realizada após 30 dias de cultivo, sendo realizada as análises de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey e/ou Duncan, sendo expressos pela média de cada variável avaliada \pm SE. Os dados obtidos nos ensaios de indução organogênese em explantes de hipocótilos, de cotilédones e de segmentos foliares e caulinares foram avaliados semanalmente pelo período de 45 dias, sendo as análises de variância e comparação de médias realizadas pelo teste de Tukey e/ou Duncan, sendo os valores expressos pela média de cada variável avaliada expressos pela média \pm SE. Os ensaios de cultivo *in vitro*, para dosagem da atividade antioxidante, foram realizados após 45 dias, bem como, a avaliação da taxa de multiplicação nas plântulas cultivadas na presença de BA e AIA utilizadas para a produção dos extratos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional SPSS 11.5.

4.3. Germinação de sementes *in vitro*

As sementes de *C. betacea* utilizadas foram retiradas de frutos maduros, colocadas sob papel toalha e dispostas em estufa Biopar S150s N° 956 a 40°C por 48h para a retirada do excesso de umidade. Após esse período, foram armazenadas em placas de Petri a temperatura ambiente até a realização dos experimentos.

As sementes utilizadas para introdução *in vitro* de *C. betacea* passaram por pré-tratamento de quebra de dormência segundo protocolo descrito por Tavares *et al.* (2007).

As sementes foram inoculadas em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento (uma semente por tubo) e cultivadas em câmara de crescimento a $25\pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16h.

4.4. Ensaio de avaliação do efeito de concentrações de benziladenina e ácido indolacético na micropropagação de *C. betacea*

A avaliação do efeito de reguladores na micropropagação de *C. betacea* foi realizada com explantes internodais com uma gema da porção mediana de plântulas mantidas em meio de cultivo MS sem a adição de reguladores de crescimento.

Foram realizadas combinações da citocinina BA (0-3 mg/L) e a auxina AIA nas concentrações (0-1 mg/L) as quais foram divididas em dois experimentos conforme tabela 2 .

Tabela 2. Experimentos 1 e 2 com diferentes concentrações de BA e AIA

Experimento 1												
BA*	0,0	1,0	2,0	3,0	0,0	1,0	2,0	3,0	0,0	1,0	2,0	3,0
AIA*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Experimento 2												
BA*	0,0	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00
AIA*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	0,5

* BA Benziladenina; AIA Ácido indolacético em mg/L.

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio e as variáveis analisadas, após 30 dias, foram: altura de planta (cm); número de gemas; número de brotos; número de raízes e comprimento da raiz maior (cm).

4.5. Indução de calos e organogênese a partir de explantes cotiledonares e de hipocótilos de *C. betacea*

Indução de calos e organogênese em *C. betacea* foi avaliada utilizando as citocininas BA e Cinetina (Cin) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1; 1,5; e 2 mg/L.

Os experimentos foram realizados em placas de Petri e as variáveis analisadas quando utilizados cotilédones como explantes foram: oxidação (P:parcial; T: Total); calos (B: borda; N: nervura (ápice ou base) e regeneração (presença ou ausência) de gemas. Quando utilizados hipocótilos como explantes, as variáveis analisadas foram: Oxidação (P:parcial; T:Total); Regeneração (presença ou ausência) de gemas; número de folhas; número de raízes, comprimento da raiz maior (cm), localização dos calos: ápice (A); base (B) e ápice e base (A/B).

Para organogênese em *C. betacea*, calos obtidos dos distintos tratamentos foram subdivididos e transferidos para meio MS sem reguladores ou com 0,5 mg/L de BA.

4.6. Calogênese e organogênese indireta a partir de segmentos foliares e caulinares de

C. betacea

Para os ensaios de calogênese e organogênese indireta de *C. betacea* foram utilizadas as auxinas: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), picloram, ácido naftalenoacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA), floroglucinol (PG- composto fenólico indutor de auxina endógena) e a citocinina N.N'-difenilurea (PDU) nas concentrações 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 mg/L, dosagens estabelecidas após teste prévio, o qual indicou que as auxinas para o *C. betacea* em concentrações maiores que 4 mg/L apresentaram efeito tóxico para os explantes testados.

Os explantes foliares apresentavam aproximadamente 1cm², preservando-se a nervura principal e sendo retiradas as bordas laterais. Já os explantes caulinares apresentavam 1cm de comprimento aproximadamente.

Os experimentos foram realizados em placas de Petri e as variáveis analisadas para ambos os explantes foram: porcentagem de calos, consistência (friáveis ou compactos); número de raízes; comprimento da raiz maior (cm); taxa de oxidação (P: parcial e T: total). Para ambos os explantes foi observada a origem do calo: nervura e/ou borda para folhas e ápice para caules.

4.7. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de suco de frutos e extratos foliares de *C.*

betacea.

Para determinação da capacidade de varredura do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foram utilizados frutos de tamarillo descascados (retirada a película fina), pesados, e triturados no liquidificador na função pulsar para que as sementes não sofressem ruptura, sem adição de água. Após a preparação do suco, o mesmo foi filtrado para separar a polpa das sementes.

A atividade antioxidante do extrato dos frutos de tamarillo foi medida através da capacidade de varredura do radical DPPH•, de acordo com Yamaguchi *et al.* (1998). Adicionou-se a 200µL do extrato, nas concentrações 50, 25 e 10% (p/v), o tampão Tris-HCl (800µL, pH 7.0) e 1000µL DPPH• dissolvido em etanol. Os tubos em duplicatas foram mantidos no escuro por 20 minutos, após foi medida a absorbância a 517nm (espectrofotômetro SHIMADZU 1700UV, Kyoto, Japan). O resultado foi expresso em IC₅₀ (quantidade de amostra necessária para varrer 50% do radical DPPH•). Para o controle foi utilizado água destilada no lugar da amostra.

Para o preparo do extrato aquoso de folhas frescas de *C. betacea*, na concentração de 10% (p/v), foram retiradas folhas da porção mediana da planta, picadas e colocadas em Becker onde foi adicionado 100 mL de água destilada, o Becker foi tampado com uma placa de Petri e a mistura fervida no microondas durante 5 minutos. Após, foi realizada a filtragem do extrato. A atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas *in vivo* de tamarillo foi medida através da capacidade de varredura do radical DPPH• (concentrações 10, 5, 1 e 0,1%), conforme descrito anteriormente.

Para avaliação da atividade das enzimas-*like*, o extrato foi preparado na concentração de 10% (p/v). A atividade SOD-*like* (superóxido dismutase) foi determinada espectrofotometricamente, medindo-se a atividade catalítica numa reação contendo 1mmol/L de adrenalina (pH 2.0) e 50mmol/L glicina (pH 10.2). Esta reação foi realizada a 30°C por 3 minutos a 480nm. Para SOD-*like*, os valores foram expressos em IC₅₀, que é a capacidade da amostra testada em varrer 50% da

adrenalina. A atividade *CAT-like* (catalase) foi determinada de acordo com método descrito por Aebi (1984), o qual quantifica a decomposição do peróxido de hidrogênio, através da avaliação a 240nm. Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ decomposto/minuto.

Para a determinação dos polifenóis totais em folhas *in vivo* de tamarillo, utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965) modificado, onde em 200µL da amostra foi adicionado 1000µL do reagente Folin Ciocalteu e 800µL de Na₂CO₃ (7,5% p/v). A mistura foi agitada e permaneceu no escuro por 30 minutos. Após este período, foi medida a absorvância a 765nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequina de 100 mL do extrato (mg Eq. catequina.100mL⁻¹).

4.8 Efeito de reguladores de crescimento na atividade antioxidante e conteúdo fenólico de extratos foliares de *C. betacea* obtidos *in vitro*.

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de *C. betacea* foram utilizados explantes obtidos da inoculação de internós com uma gema cultivados *in vitro* por 45 dias em meio MS utilizando a citocinina BA nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1 mg/L combinadas ou não com a auxina AIA nas concentrações 0,1 e 0,2 mg/L, totalizando seis tratamentos.

Após 45 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm); número de gemas; número de brotos; número de raízes e comprimento da raiz maior (cm).

Para o preparo do extrato aquoso realizado com folhas frescas de *C. betacea in vitro*, na concentração de 10% (p/v), foram utilizadas folhas inteiras de todas as partes da planta. Colocadas em um Becker, onde foi adicionado 100 mL de água destilada, tampado com uma placa de Petri e a mistura foi fervida no microondas durante 5 minutos, a seguir foi feita a filtração. Sendo repetido este processo para cada um dos seis tratamentos de cultivo *in vitro*.

A atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de cultivo *in vitro* foi medida através da capacidade de varredura do radical DPPH•, da atividade das enzimas SOD e CAT, como também foi realizada a determinação dos fenóis totais segundo metodologia descrita anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito das concentrações de benziladenina e ácido indolacético na micropropagação de *C. betacea*.

Entre os diversos fatores físicos e químicos que afetam a resposta vegetal *in vitro*, os reguladores de crescimento exógenos destacam-se como os mais importantes. Os reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultivo permitem, dependendo do regulador e sua concentração, modular o desenvolvimento vegetal estimulando a parte aérea ou radicular (Grattapaglia & Machado, 1998).

Visando a micropropagação de *C. betacea*, explantes nodais com uma gema foram inoculados em meio MS contendo 0 a 3 mg/L da citocinina benziladenina (BA) combinada com 0 a 1 mg/L da auxina ácido indolacético (AIA).

Os resultados (figura 6) mostraram que a adição de BA, independente da presença de AIA, leva a uma redução significativa da altura de planta mesmo na menor concentração avaliada (1 mg/L), esta redução acompanhou o aumento de concentração da citocinina, atingindo >75% de redução no comprimento com 3 mg/L de BA. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Gatita e Almeida (2003), que observaram maior altura de plantas de *C. betacea* regeneradas a partir de cotilédones e hipocótilos, em meio sem reguladores de crescimento.

Da mesma forma, a adição de BA no meio de cultivo causou a redução do número de gemas axilares (figura 6), a qual foi de um modo geral, proporcional à concentração de BA, independente da presença ou concentração de AIA utilizada. A adição benziladenina também levou a redução,

apesar de não significativa, do número de brotos adventícios (figura 6). O baixo desenvolvimento de gemas axilares e brotos adventícios indicam uma importante dominância apical em *C. betacea*, conforme previamente observado por Gatita e Almeida (2003) e Orrego *et al.* (2005).

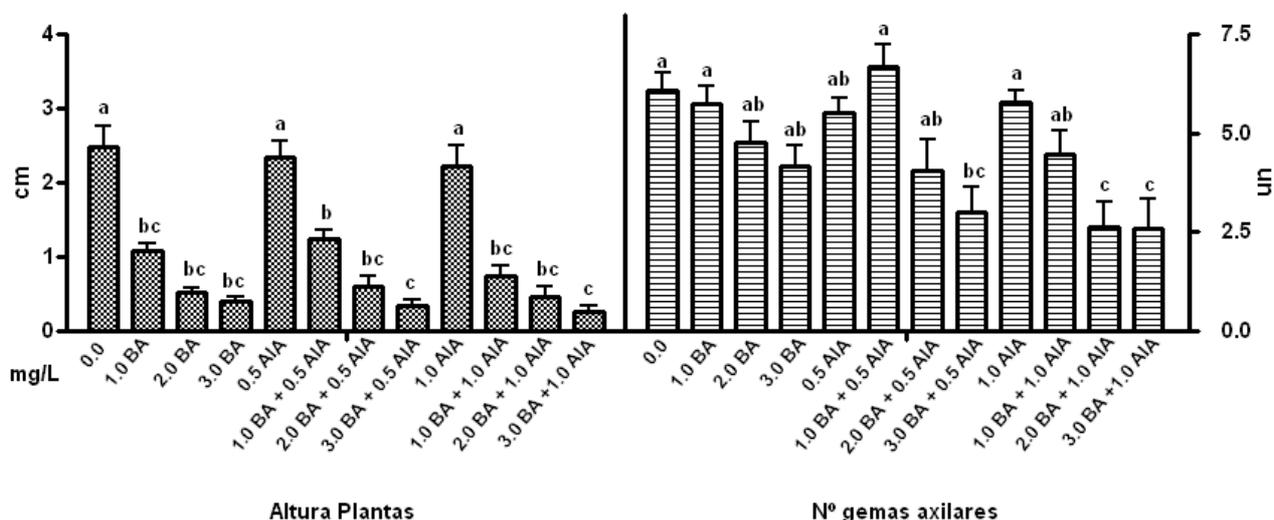


Figura 6. Efeito da concentração de BA e AIA na multiplicação *in vitro* de *C. betacea* após 30 dias de cultivo (Médias \pm SE). Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

No que diz respeito ao enraizamento, a adição de BA, independente da concentração, inibiu o desenvolvimento de raízes (figura 7), enquanto que a incorporação de AIA no meio de cultivo provocou aumento significativo no número de raízes por explante. Já para a variável comprimento da raiz maior, foi observada redução significativa entre o controle sem reguladores e as duas concentrações de AIA utilizadas. A inibição do enraizamento por parte das citocininas e o estímulo à diferenciação de raízes por auxinas em cultivos *in vitro* tem sido evidenciado em um grande número de espécies vegetais (Torres *et al.* 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). Elevada taxa de enraizamento em *C. betacea*, mesmo em meios sem auxinas foi constatada por Gatita e Almeida (2003).

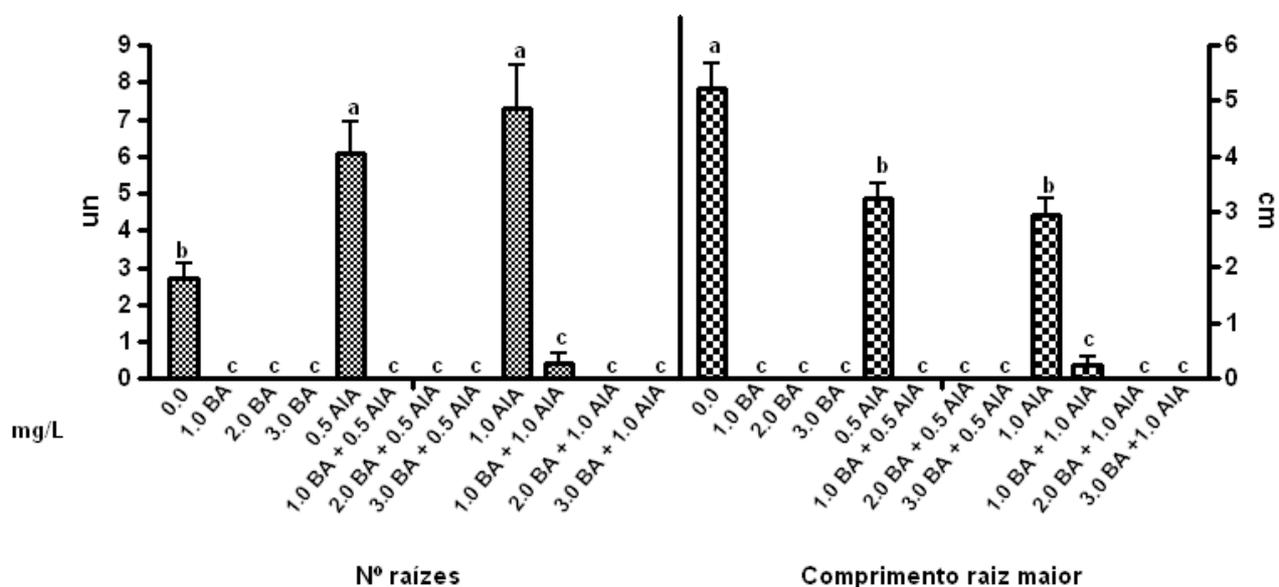


Figura 7. Efeito de reguladores de crescimento sobre o enraizamento *in vitro* de *C. betacea* após 30 dias de cultivo (Médias \pm SE). Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Considerando os resultados deste primeiro experimento, foi desenvolvido um novo ensaio avaliando concentrações menores de reguladores, variando entre 0 e 1 mg/L de BA e 0 a 0,5 mg/L de AIA. Conforme pode ser observado na Figura 8, mesmo concentrações da ordem de 0,25 mg/L de BA levam a uma redução significativa do comprimento de planta. O número de gemas axilares mostrou redução apenas na presença de 1 mg/L de BA, enquanto o número de brotos adventícios sofreu aumento significativo nesta concentração (figura 8). Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Orrego *et al.* (2005) que determinaram uma concentração ótima de 0,17 mg/L de BA para o crescimento em alongamento para um cultivar oriundo do norte de Antioquia (Colômbia) e observaram baixas taxas de multiplicação *in vitro* para esta espécie. Cabe ressaltar que estes autores constataram importante efeito do genótipo de *C. betacea* (cultivar) sobre o comportamento *in vitro*, indicando a necessidade de experimentação específica para cada material a ser propagado.

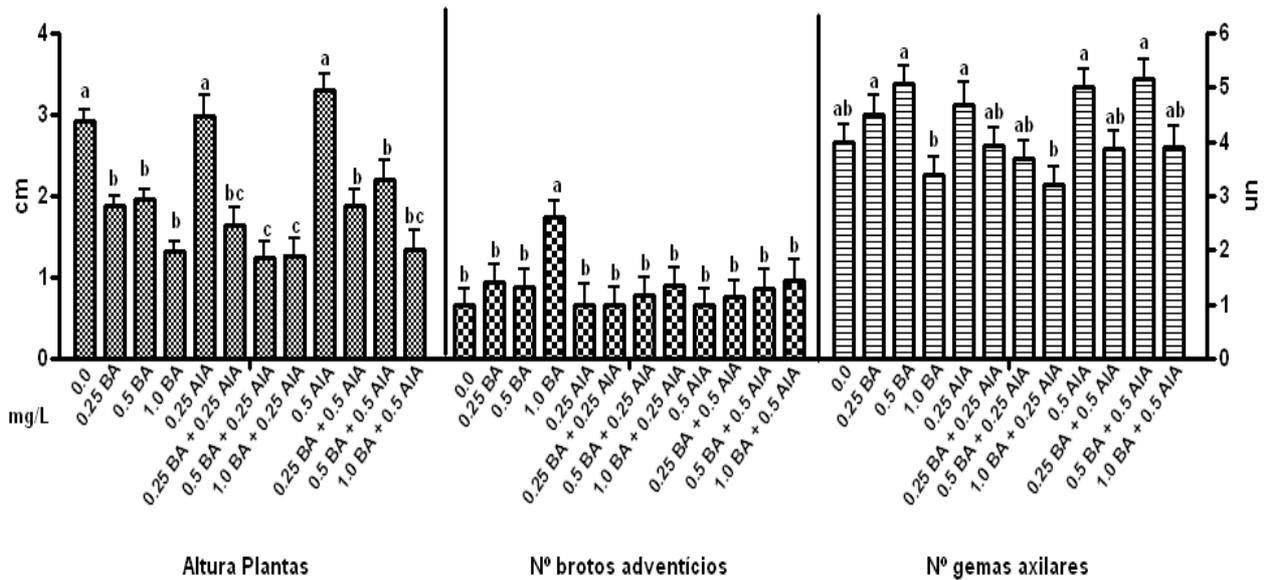


Figura 8. Efeito da adição de baixas concentrações de BA e AIA na multiplicação *in vitro* de *C. betacea* após 30 dias de cultivo (Médias \pm SE). Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Conforme observado no primeiro experimento, não foram evidenciadas diferenças significativas para as variáveis número de gemas e número de brotos na presença de 0,25 ou 0,5 mg/L de AIA (figura 8). Por outro lado, um aumento significativo no número de raízes foi constatado quando esta auxina foi adicionada, sendo este aumento proporcional à concentração de AIA no meio (Figura 9 e 10). Entretanto, o aumento no número de raízes não foi acompanhado por incremento significativo no comprimento radicular (figuras 9 e 10), fato esperado considerando que as auxinas estimulam a diferenciação de meristemas radiculares, mas apresentam efeito deletério sobre a alongamento de raízes (Grattapaglia & Machado, 1998).

Na presença de BA e AIA foi evidenciado um aumento do número de explantes com calos na porção inferior, atingindo 82% dos explantes em meios contendo 0,5 a 1 mg/L de BA com 0,25 a 0,5 mg/L de AIA (figura 10).

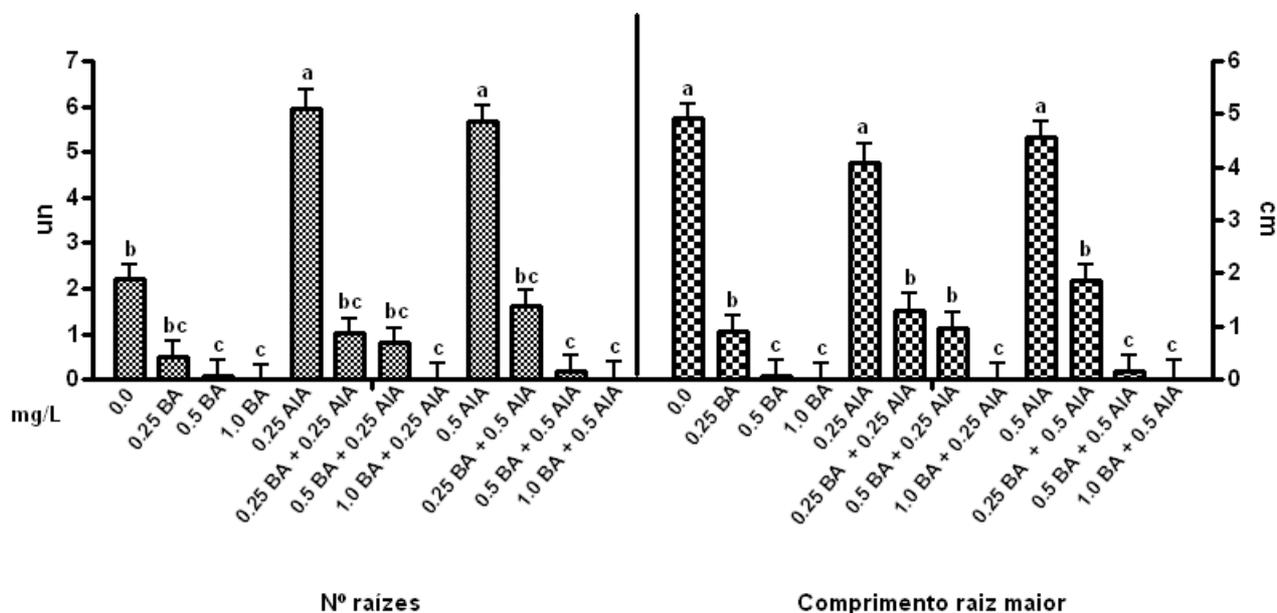


Figura 9. Efeito da adição de baixas concentrações de BA e AIA no enraizamento *in vitro* de *C. betacea* (Médias \pm SE) após 30 dias de cultivo. Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)



Figura 10. Aspecto geral de plântulas *in vitro* de *C. betacea* em diferentes combinações de BA e AIA após 30 dias de cultivo.

De um modo geral os resultados obtidos indicam uma forte dominância apical em *C. betacea* fato que reduz a possibilidade de multiplicação *in vitro* através de desenvolvimento de brotos adventícios. Por outro lado, o comportamento desta planta quanto ao crescimento em alongamento e conseqüente alto número de gemas axilares, permite a multiplicação vegetativa através de subdivisão de plântulas em segmentos nodais. Considerando o número de brotos axilares a taxa de multiplicação na ausência de reguladores de crescimento é da ordem de aproximadamente 7,5 vezes a cada 30 dias, taxa esta superior à pontada por Hoyos e Kafuri (1998) em meio MS com 0,1 mg/L de AIA.

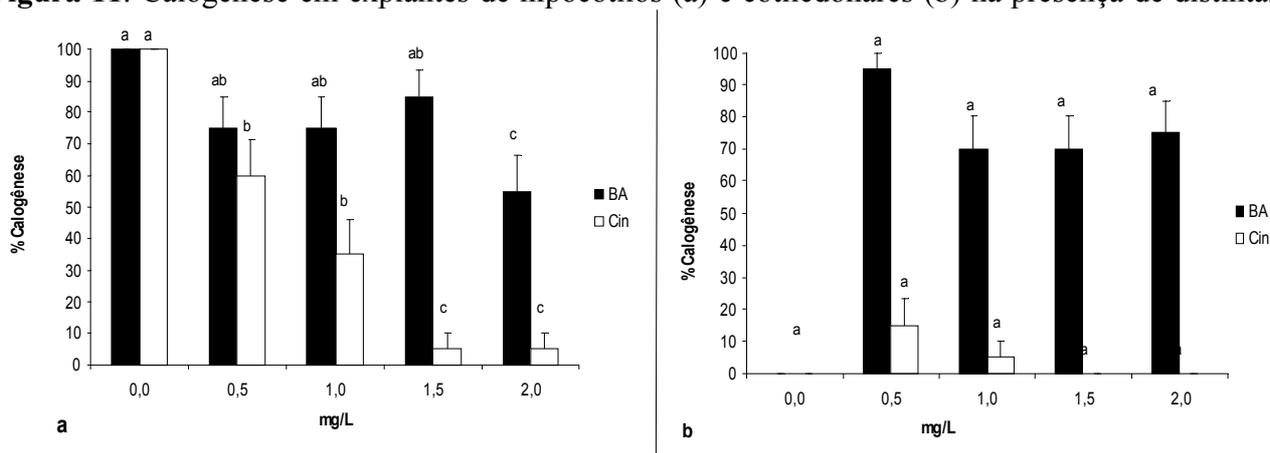
5.2. Indução de calos e organogênese a partir de explantes cotiledonares e de hipocótilos de *C. betacea*.

Visando a organogênese direta em *C. betacea*, foram utilizados como explantes hipocótilos e cotilédones obtidos a partir da germinação de sementes de cultivar de frutos amarelos. As citocininas benziladenina (BA) e cinetina (Cin) em concentrações de 0 a 2 mg/L foram adicionadas ao meio MS. As variáveis analisadas foram oxidação (parcial ou total), calos (borda, nervura), regeneração, número de folhas, presença de raízes, número de raízes e comprimento da raiz maior.

De um modo geral, os resultados obtidos apontaram uma resposta calogênica superior por parte dos explantes de hipocótilo (figura 11). Todos (100%) dos explantes de hipocótilos apresentaram formação de calos na ausência de reguladores (figura 11), com uma pequena redução, não significativa, na presença de 0,5 a 1,5 mg/L de BA e redução significativa com 2 mg/L desta citocinina. Por outro lado, uma redução dose dependente na taxa de calogênese foi constatada na presença de cinetina, atingindo valores da ordem de <10% de explantes com calos em concentrações de 1,5 e 2 mg/L de Cin.

No caso de explantes cotiledonares, não foi observada formação de calos na ausência de reguladores. Baixas concentrações de BA (0,5 mg/L) induziram a calogênese, não havendo aumento da mesma em concentrações superiores deste regulador. Neste tipo de explantes, a cinetina promoveu um pequeno aumento na calogênese (figura 11).

Figura 11. Calogênese em explantes de hipocótilos (a) e cotiledonares (b) na presença de distintas



concentrações de BA e Cin (Média± SE) após 45 dias de cultivo. Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Em explantes e calos cotiledonares não foi observada regeneração de plantas, enquanto, explantes de hipocótilos e seus calos apresentaram respostas morfogênicas. Conforme pode ser visto na tabela 3, 15% dos fragmentos de hipocótilos inoculados apresentaram regeneração, com 10% exibindo folhas e 25% raízes. A presença de BA 0,5 mg/L aumentou a taxa de regeneração para 65%, com redução em concentrações superiores desta citocinina. Em meios contendo BA foi constatado aumento no desenvolvimento da parte aérea (explantes com folhas) atingindo máximo de 20% com 1 mg/L de BA. Assim como em experimentos de micropropagação, a BA inibiu completamente a formação de raízes.

Tabela 3. Porcentagem de explantes de hipocótilo com regeneração na presença de distintas concentrações de BA e Cin (porcentagem±SE) após 45 dias de cultivo.

mg/L	Regeneração		Folhas		Raízes	
	BA	Cin	BA	Cin	BA	Cin
0,0	15±0,61 ^{c*}	15±0,72 ^b	10 ±0,63 ^c	10 ±0,29 ^b	25 ±0,59 ^a	25 ±0,58 ^b
0,5	65±0,94 ^a	25 ±0,67 ^a	15±0,80 ^b	40 ±0,71 ^a	0 ±0,01 ^b	45 ±0,07 ^a
1,0	35 ±0,70 ^b	15 ±0,70 ^b	20 ±0,72 ^a	5 ±0,58 ^c	0 ±0,01 ^b	25±0,69 ^b
1,5	15 ±0,35 ^c	0 ±0,01 ^d	5 ±0,61 ^d	0 ±0,01 ^d	0 ±0,01 ^b	15±0,74 ^d
2,0	35±0,75 ^b	10±0,32 ^c	10±0,31 ^c	0 ±0,01 ^d	0 ±0,01 ^b	20 ±0,61 ^c

* Letras distintas dentro da mesma variável diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$) entre as dosagens de cada regulador de crescimento (BA e Cin);

BA- benziladenina; Cin- cinetina em mg/L.

A cinetina (0,5 mg/L) aumentou a taxa de regeneração para 25%, valor inferior ao observado na mesma concentração de BA. Porém, esta citocinina em baixa concentração (0,5 mg/L) apresentou a maior frequência de explantes com folhas e raízes, sendo assim mais indicada para a indução de regeneração direta.

Até o momento, não há relatos quanto à regeneração direta de *C. betacea* a partir de explantes de hipocótilo ou cotilédones. Entretanto, Hoyo e Kafuri. (1998) apontam taxas de regeneração da ordem de 37,5% em explantes de folhas jovens de *C. betacea* cultivadas na presença de 2 mg/L de BA. Já, resultados obtidos em experimentos de embriogênese somática indireta apontam a formação de calos embriogênicos em tratamentos com auxinas fortes como 2,4-D ou picloram (Guimarães *et al.*, 1988; Lopes *et al.*, 2000; Maia, 2002; Canhoto *et al.*, 2005) em distintos tipos de explantes de *C. betacea*.

Um dos maiores problemas evidenciados na regeneração direta de *C. betacea* foi a oxidação fenólica dos explantes e calos. De acordo com os resultados apresentados na tabela 4, a oxidação total de explantes atingiu 100% no caso de cotilédones e 20% em hipocótilos, sendo parcial nos explantes restantes. Uma redução substancial da oxidação foi evidenciada apenas em altas concentrações de cinetina (>1 mg/L).

Tabela 4. Porcentagem de explantes com oxidação parcial ou total em distintas concentrações de BA e Cin (porcentagem±SE).

Doses	Hipocótilos				Cotilédones			
	BA		Cin		BA		Cin	
	Parcial	Total	Parcial	Total	Parcial	Total	Parcial	Total
0,0	65±3,54 ^{b*}	20±1,32 ^c	65±3,63 ^a	20±0,96 ^a	0,0±0,01 ^c	100±2,53 ^a	0±0,01 ^c	100±0,01 ^a
0,5	70±0,94 ^a	15±0,97 ^d	40±1,80 ^b	20±1,71 ^a	0±0,01 ^c	100±3,22 ^a	0±0,01 ^c	100±0,01 ^a
1,0	40±0,70 ^d	55±0,70 ^a	30±2,72 ^c	20±1,98 ^a	5±0,72 ^b	95±3,69 ^a	65±2,53 ^b	35±2,31 ^b
1,5	45±0,42 ^c	55±0,91 ^a	10±0,21 ^e	0±0,01 ^c	5±0,91 ^b	95±2,49 ^a	70±1,83 ^a	30±3,53 ^{bc}
2,0	45±0,75 ^c	35±0,32 ^b	15±0,31 ^d	5±0,01 ^b	10±0,99 ^a	90±3,61 ^b	5±0,51 ^c	25±2,53 ^c

* Letras distintas dentro da mesma variável correspondem a taxas de oxidação significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P>0,05$) entre os tratamentos de cada regulador de crescimento (BA e Cin) para cada tipo explante (hipocótilo e cotilédone);

BA- benziladenina; Cin- cinetina em mg/L.

Elevadas taxas de oxidação fenólica foram constatadas por Orrego *et al.* (2005) em experimentos de propagação de *C. betacea*. Segundo estes autores, a adição de substâncias antioxidantes não reduz significativamente a taxa de oxidação nesta espécie. Por outro lado, Obando e Jordan (2001) apontam que a adição de TDZ pode reduzir a atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) levando à diminuição da produção de fenóis.

Os calos dos distintos tratamentos foram subdivididos e transferidos para meio MS sem reguladores e com 0,5 mg/L de BA e cultivados sob fotoperíodo de 16h luz/8h escuro a 25°C. Nestas condições a maior parte dos calos apresentaram rápida oxidação fenólica, com apenas alguns pontos esbranquiçados. A ocorrência destas regiões distintas não obedeceu nenhuma lógica em termos de origem ou presença de BA. Após três repiques mensais, uma parte dos calos oriundos dos tratamentos sem reguladores, cultivados em meio com 0,5 mg/L de BA, começaram a apresentar sinais de regeneração. Estes calos quando cultivados por mais um período em meio MS + 0,5 mg/L de BA exibiram a formação de plântulas, as quais são exibidas na figura 12.

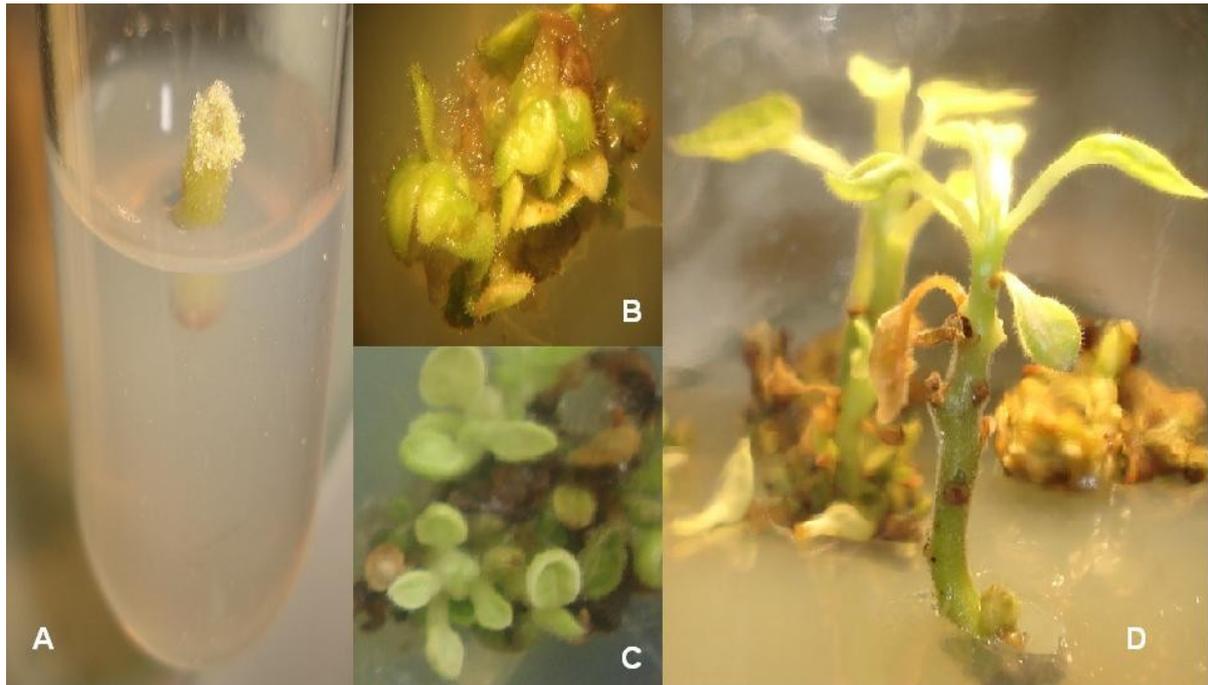


Figura 12. Regeneração de plantas: a) calos obtidos em meio MS sem reguladores de crescimento; b) e c) calo transferido para meio MS com 0,5 mg/L de BA com as folhas e pequenas plântulas; d) plântulas regeneradas indiretamente a partir de calos (sem reguladores) inoculados em MS + 0,5 mg/L BA.

Análise microscópica das regiões de diferenciação (dados não apresentados) mostraram que a regeneração obtida ocorreu por organogênese, não sendo detectada nenhuma estrutura embrionária.

Apesar de lenta, esta forma de multiplicação pode ser considerada para fins de obtenção de plantas de *C. betacea*, sendo, entretanto necessária análise do comportamento das plantas regeneradas *in vivo* e avaliação da estabilidade genética durante o processo organogênico.

Dificuldade na obtenção de embriogênese somática em calos de *C. betacea*, e particularmente, de regeneração dos mesmos foi constatada por Lentini (2002), assim como no presente trabalho.

5.3. Calogênese e organogênese indireta a partir de segmentos foliares e caulinares de *C. betacea*.

Para a obtenção de calos e organogênese indireta a partir de explantes foliares e caulinares de *C. betacea* foi avaliado o efeito das auxinas ácido 2,4-difenoxiacético (2,4-D), picloram, ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA), do composto fenólico floroglucinol (PG) e da citocinina difeniluréia (PDU) em concentrações variadas de 0-4 mg/L.

Na ausência de reguladores de crescimento os explantes foliares exibiram calos cicatriciais na nervura (figura 13). A presença destes calos cicatriciais foi reduzida para 50% no tratamento contendo 1,5 mg/L de PG e completamente inibida na presença de concentrações superiores (2-4 mg/L) deste regulador ou na presença da citocinina PDU. Por outro lado, as auxinas 2,4-D, ANA, picloram e 4-CPA estimularam o desenvolvimento de calos, inicialmente em toda a borda dos explantes e posteriormente no explante todo (figura 13). Assim como ocorreu nos explantes de hipocótilo e cotilédones (tabela 4), foi observada elevada oxidação fenólica dos explantes. Como pode ser observado na figura 13, esta oxidação ocorreu principalmente na borda dos fragmentos foliares, sendo mais intensa nos tratamentos contendo 4-CPA e ANA.

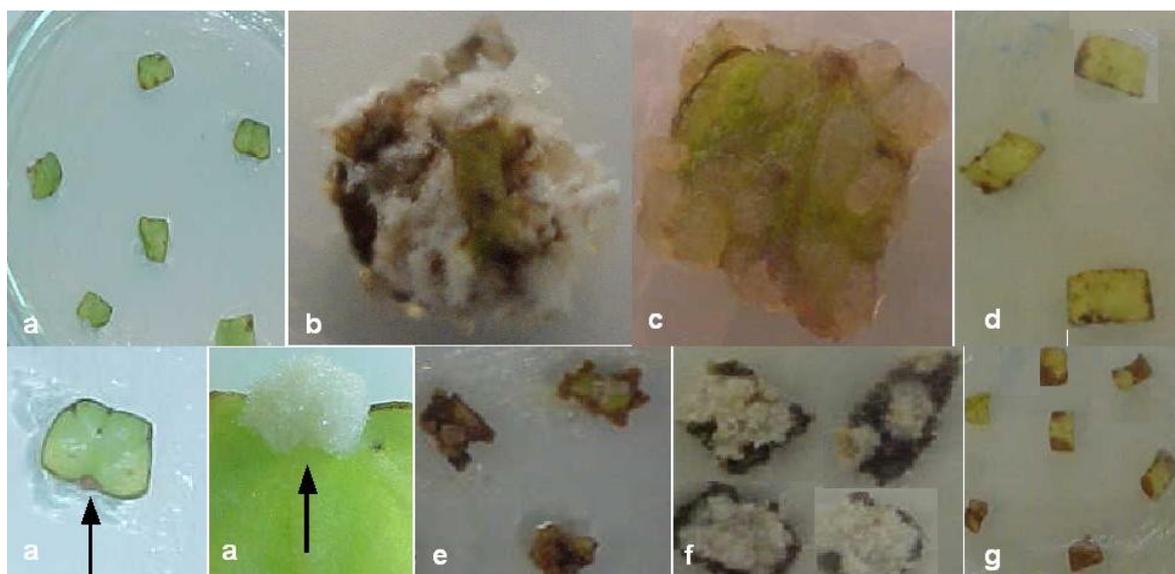


Figura 13. Aspecto dos calos formados a partir de explantes foliares de *C. betacea* em meio MS. Tratamentos: a) sem reguladores; b) 1 mg/L 2,4-D; c) 2 mg/L picloram; d) 2 mg/L PDU; e) 0,5 mg/L 4-CPA; f) 2 mg/L ANA; g) 1,5 mg/L PG.

Os calos presentes nas bordas e no centro dos explantes foliares foram considerados como indução de calogênese. Assim sendo, a adição da auxina 2,4-D no meio de cultivo estimulou a calogênese, atingindo 100% de explantes com calos em concentrações de 1 a 2 mg/L. Na concentração de 4 mg/L a percentagem de calogênese reduziu para 18% em decorrência de aumento na oxidação dos explantes (figura 14).

De forma semelhante, elevada taxa de calogênese foi evidenciada em meios contendo picloram (0,5-2 mg/L) e ANA (1,5-2 mg/L), e ausência de calos e alta oxidação foi detectada em 4 mg/L de ambos reguladores (figura 14). Na presença da auxina 4-CPA o comportamento foi diferente, com alta taxa de calogênese em 0,5 mg/L e redução em concentrações superiores a 1 mg/L. Assim como nas outras auxinas, a redução da calogênese foi acompanhada por um aumento na

taxa de oxidação dos explantes. A morfologia dos calos obtidos em cada um destes reguladores pode ser vista na figura 15.

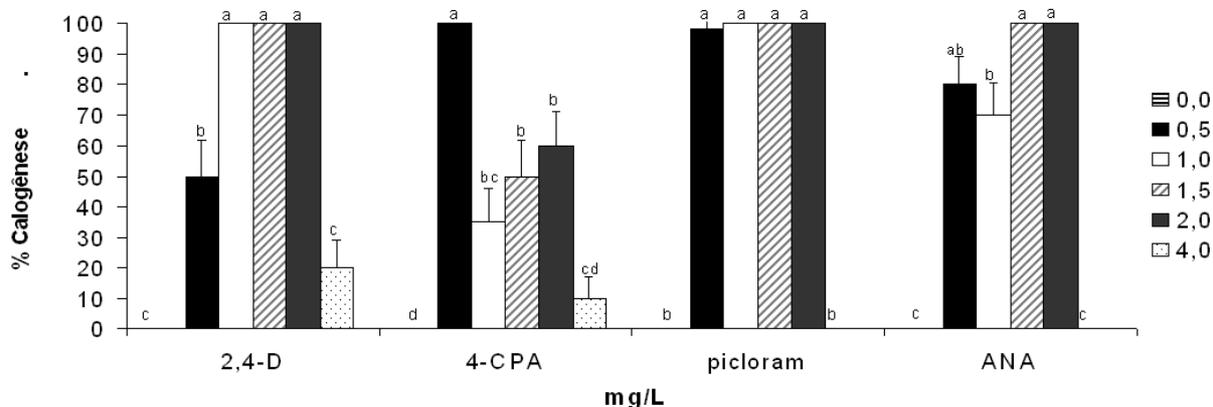


Figura 14. Efeito de 2,4-D, picloram, ANA e 4-CPA sobre a calogênese em explantes foliares de *C. betacea*. (Média± SE). Letras distintas dentro da mesma variável para cada tratamento, correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Nos explantes caulinares, a presença de calos apenas na base foi considerada como resposta cicatricial, porém uma quantidade importante (45%) dos explantes na ausência de reguladores também formaram calos no ápice (figuras 15 e 16). A oxidação total foi predominante nesses explantes conforme pode ser observado na figura 15.

Em meios contendo 2,4-D foi observado aumento da calogênese. Na concentração de 0,5 mg/L foi obtida uma média de 62% de explantes com calos, elevando para 98% com 1 mg/L e atingindo 100% em concentrações maiores (figura 16). Apesar de menor taxa de calogênese, os calos obtidos em 0,5 mg/L de 2,4-D exibiram menor oxidação e aspecto mais friável do que os calos que se desenvolveram em concentrações maiores deste regulador (figura 15).

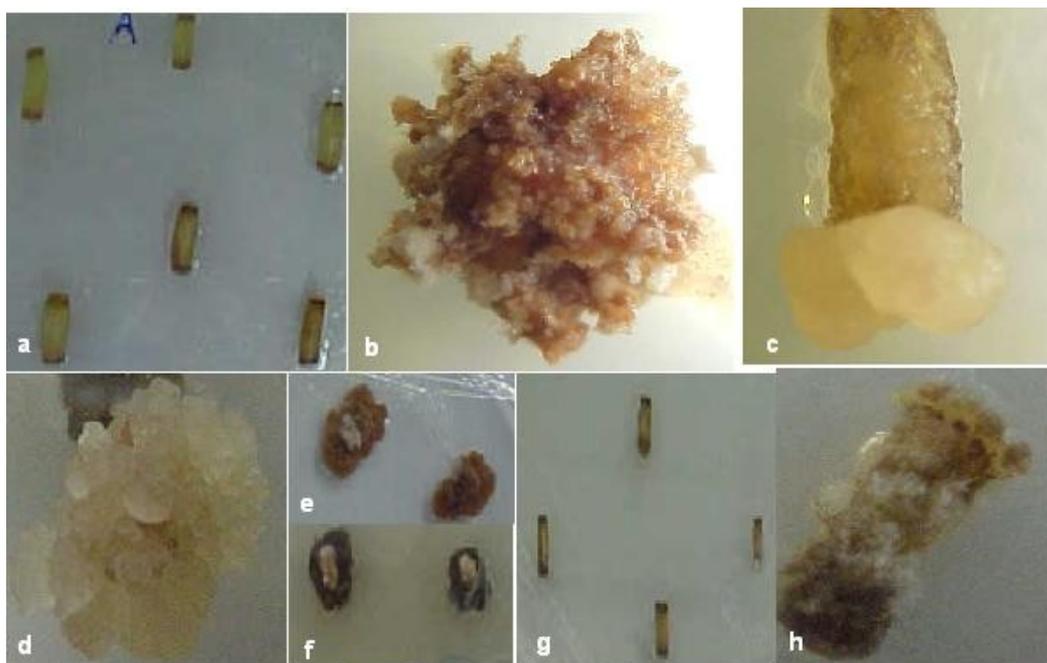


Figura 15. Aspecto dos calos formados a partir de explantes caulinares de *C. betacea* em meio MS. Tratamentos: a) sem reguladores; b) 2 mg/L 2,4-D; c) 1,5 mg/L picloram; d) 1 mg/L 2,4-D; e) 0,5 mg/L 4-CPA; f) 1,5 mg/L ANA; g) 2 mg/L PG; h) 2 mg/L PDU.

Altas taxas de calogênese também foram obtidas em meios contendo 4-CPA (figura 16). Entretanto, a oxidação neste caso foi muito elevada, restringindo o desenvolvimento posterior dos calos (figura 15). O picloram em concentrações de 0,5 a 1,5 mg/L estimulou a calogênese, mas concentrações superiores (2 e 4 mg/L) apresentaram efeito tóxico evidenciado por alta oxidação e morte dos explantes (figuras 15 e 16).

Meios com ANA mostraram indução da calogênese dose dependente, atingindo 100% de explantes com calos em meio com 2 mg/L de ANA. Na concentração de 4 mg/L ocorreu morte de explantes com alta oxidação fenólica (figuras 15 e 16).

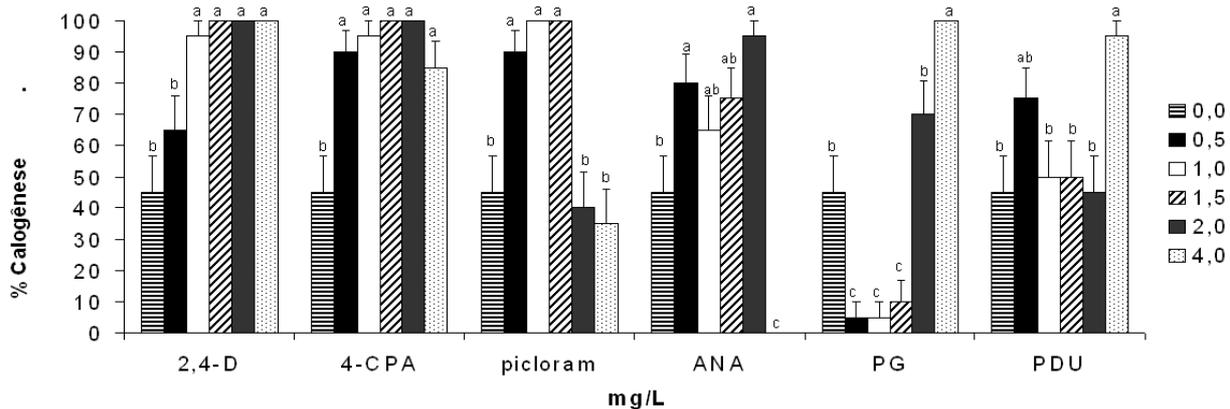


Figura 16. Efeito de 2,4-D, picloram, ANA, 4-CPA, PG e PDU sobre a calogênese em explantes caulinares de *C. betacea*. (Média± SE). Letras distintas dentro da mesma variável para cada tratamento, correspondem a médias significativamente distintas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Diferente do observado em explantes foliares, aumento da calogênese foi evidenciada em meio contendo PG e PDU. No caso de floroglucinol, baixas concentrações determinaram redução da calogênese, enquanto um aumento dose dependente foi observado em concentrações superiores deste regulador, atingindo 100% de explantes com calos em meio contendo 4 mg/L de PG. Já na presença da citocinina PDU, aumento de calogênese foi evidenciado apenas em 4 mg/L do regulador.

Formação de raízes foi evidenciada apenas num pequeno grupo de tratamentos: (a) 10% de explantes mantidos em meio com 0,5 mg/L de PG apresentaram um raiz com média de 4,2 cm de comprimento, e (b) 5% e 20% dos explantes em meios com 2 e 4 mg/L de PDU apresentaram raízes curtas (1,6 a 2,1 cm).

Quanto ao tipo de calos, fundamentalmente dois tipos foram evidenciados: calos friáveis de coloração clara com distintos graus de oxidação foram preponderantes em meios contendo 2,4-D, ANA e picloram; e calos compactos com sinais de oxidação fenólica ao longo do período de cultivo foram comuns em meios contendo 4-CPA (figuras 13 e 15). Em nenhum dos tratamentos e explantes utilizados foram obtidos calos embriogênicos.

De acordo com Canhoto *et al.* (2005) calos embriogênicos são obtidos a partir de explantes foliares e internodais de *C. betacea* cultivados no escuro em meio MS contendo 2,4-D ou picloram associados à cinetina. Entretanto, este tipo de calos não foram obtidos no presente trabalho, fato que pode ser atribuído ao genótipo (cultivar) utilizado, já que diferenças importantes de comportamento *in vitro* tem sido uma constante em *C. betacea* (Canhoto *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2009).

Guimarães *et al.* (1988), Guimarães *et al.* (1996) e Lopes *et al.* (2000) observaram a formação de calos embriogênicos e embriogênese somática direta a partir de embriões maduros, segmentos de hipocótilos, segmentos internodais e folhas jovens de *C. betacea*. Nestes trabalhos, as auxinas 2,4-D e picloram isoladamente ou em associação com citocininas estimularam a embriogênese. Segundo Guimarães *et al.* (1988) a associação 2,4-D e cinetina leva a formação de calos compactos que oxidam rapidamente.

Guimarães *et al.* (1996) obtiveram 80% de explantes com calos embriogênicos em meio com 2 mg/L de ANA, especialmente quando associado a altas concentrações de sacarose (9%). Entretanto, o número de embriões produzidos em ANA é baixo e com anormalidades morfológicas evidentes.

O uso dos reguladores PG, PDU e 4-CPA no cultivo *in vitro* de *C. betacea* não tem sido relatado até o momento, entretanto, estes reguladores tem-se mostrado eficientes em outras espécies como *Solanum tuberosum* (Sarkar & Naik, 2000), *Malus domestica* (Rustaei *et al.*, 2009), entre outras.

O floriglucinol apresenta efeito potencializador da ação auxínica endógena, fato que pode explicar a sua capacidade de indução de calos a partir de explantes caulinares de *C. betacea*. Já o PDU é um herbicida com atividade de citocinina derivado da uréia, assim como o tidiazuron, a benziladenina, o diuron e o monuron (Srinivasan *et al.*, 2006). Este regulador tem sido pouco aplicado em cultivo *in vitro*, mas tem se mostrado eficiente na indução de calos em *Phaseolus lunatus* (Mok *et al.*, 1979), *Medicago sativa* e *Coleus forskohlii* (Srinivasan *et al.*, 2006).

Assim como no presente trabalho, a oxidação fenólica ou “browning” tem sido uma constante em trabalhos com *C. betacea*. A oxidação fenólica ocorre inicialmente nos locais de corte, principalmente em plantas lenhosas como *C. betacea*, alastrando-se posteriormente por todo o explante (Torres *et al.*, 1998). Segundo Obando e Jordan (2001) a oxidação em *C. betacea* diminui quando se iniciam eventos morfogênicos. Estes autores atribuem esta redução ao aumento no conteúdo de proteínas solúveis.

5.4. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de suco de frutos e extratos foliares de *C. betacea*.

Além do sabor e aroma, as frutas contribuem com uma parcela importante das vitaminas, minerais e outros compostos bioativos na dieta humana. Neste sentido, estudos epidemiológicos mostram alta correlação entre o consumo de frutas e uma redução no risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Tais efeitos benéficos tem sido relacionados à combinação de vitaminas, minerais, antioxidantes fenólicos e fibras presentes em frutos (Ruxton *et al.*, 2006).

Além das propriedades nutricionais dos frutos de *C. betacea* (Vasco *et al.*, 2009), esta planta tem sido apontada como potencial fonte de antioxidantes (Kou *et al.*, 2009). Assim sendo, passamos a avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e o conteúdo fenólico de frutos e extratos de folhas de dois cultivares de *C. betacea*.

Os resultados mostram que os frutos maduros apresentam maior atividade antioxidante, do que frutos imaturos, os extratos foliares analisados neste trabalho mostraram maior atividade antioxidante do que a observada para os frutos. Extrato foliar do cultivar laranja mostrou melhor atividade CAT-like do que a cultivar laranja, (tabela 5).

Tabela 5- Atividade antioxidante de sucos de frutos e extratos foliares de *C. betacea* *in vivo*.

Amostra	DPPH• (IC ₅₀)	Polifenóis Totais (mg Eq. Catequina.100mL ⁻¹)	CAT-like (mmolH ₂ O ₂ .min ⁻¹)
Extrato foliar - cultivar Laranja	3,23 ± 0,01 ^c	1327,06 ± 44,35 ^a	15,00 ± 0,10 ^a
Extrato foliar -cultivar Vermelho	3,56 ± 0,01 ^c	1521,95 ± 69,69 ^a	9,4 ± 2,70 ^b
Suco de fruto imaturo – Cultivar Vermelho	38,01 ± 0,57 ^b	ND	ND
Suco de frutos maduros – cultivar Vermelho	61,37 ± 0,20 ^a	ND	ND

* Letras distintas diferem significativamente pelo pós-teste de Tukey (0,05) para cada parâmetro avaliado.

ND- Não determinado.

IC₅₀- quantidade de amostra necessária para varrer 50% do radical DPPH•

A atividade antioxidante de frutos de *C. betacea* tem sido associada ao conteúdo de ácido ascórbico (Gordon *et al.*, 2007), delfinidina e pelargonina (Hurtado *et al.*, 2009), e compostos fenólicos totais (Mertz *et al.*, 2008; Kou *et al.*, 2009). A comparação entre cultivares, tem mostrado maior atividade antioxidante em frutos vermelhos do que amarelos (Gordon *et al.*, 2007), porém segundo os resultados obtidos no presente trabalho, tal diferença não se observa em extratos foliares destes cultivares. Esta aparente discrepância pode ser atribuída ao fato de que os principais antioxidantes apontados nos frutos (ácido ascórbico e antocianos derivados de cianidina, delfinidina e pelargonidina), não são acumulados em folhas. Diferenças na atividade antioxidante de distintas partes dos frutos em diferentes estágios de maturação foram previamente observados por Gordon *et al.* (2007).

5.5. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro*, atividade antioxidante e conteúdo fenólico de extratos foliares de *C. betacea*

Assim como nos experimentos anteriores, a adição de BA no meio de cultivo levou a redução significativa na altura de plantas, e a um leve aumento, em geral não significativo no

número de brotos adventícios e gemas axilares (figura 17). Por outro lado, a adição de 0,1 mg/L de AIA não afetou significativamente a altura de plantas e o número de brotos, mas levou a redução no número de gemas axilares. A análise dos dados mostrou ausência de interação BA/AIA nas dosagens utilizadas para os parâmetros avaliados.

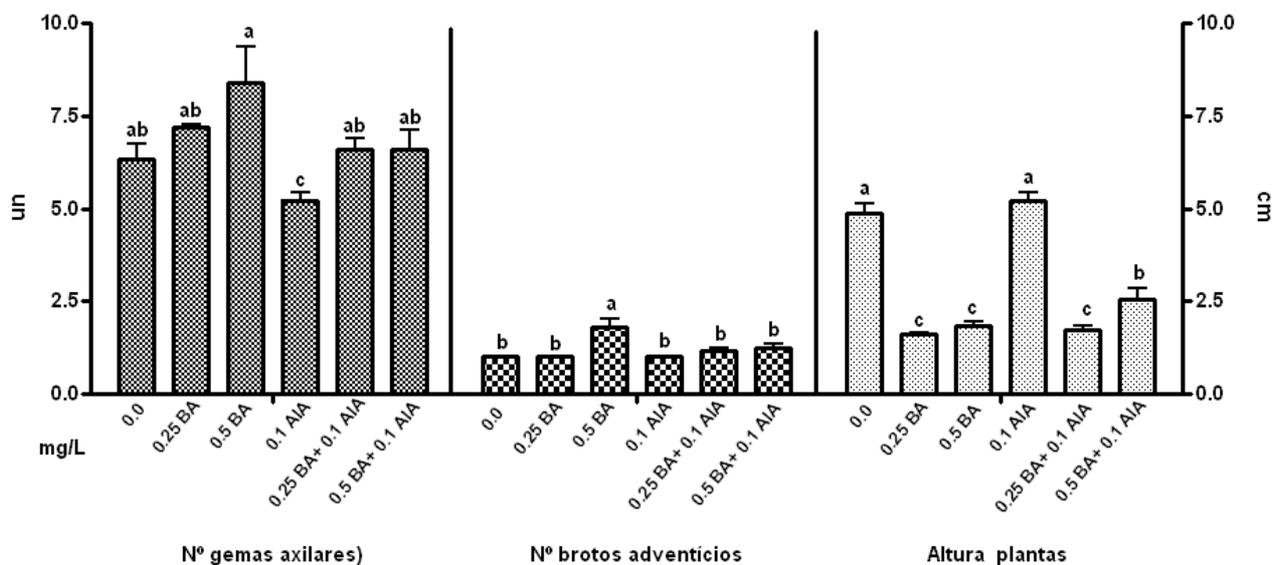


Figura 17. Efeito de reguladores (BA e AIA) na indução da parte aérea de *C. betacea*. Após 45 dias de cultivo (Média \pm SE). Letras distintas entre os tratamentos diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Por outro lado, conforme pode ser visto na figura 18, a BA provocou redução no número de raízes e no comprimento radicular, enquanto a adição de baixa concentração de AIA foi suficiente para elevar de forma significativa o número de raízes, sem afetar entretanto, o comprimento das mesmas. A auxina AIA (0,1 mg/L) reverteu parcialmente o efeito inibitório da BA (0,25 mg/L) sobre o enraizamento.

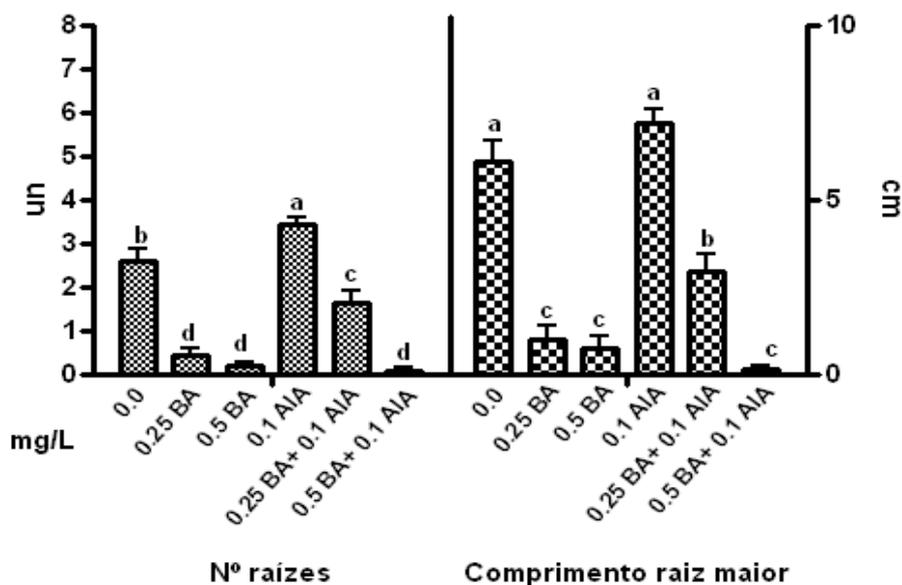


Figura 18. Efeito de reguladores (BA e AIA) sobre o enraizamento *in vitro* de *C. betacea* após 45 dias de cultivo (Média ± SE). Letras distintas entre os tratamentos diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

A atividade antioxidante pode ser definida como a capacidade de remover radicais livres formados por processos oxidantes, os quais causam danos oxidativos para o tecido, afetando a integridade e função das células (Zhao *et al.*, 2005). Antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação da cadeia de reação de oxidação, sendo que diversas moléculas podem ser consideradas antioxidantes, como a vitamina C, carotenóides, fenóis e flavonóides (Larson, 1988; Tepe *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que a presença de BA no meio de cultivo durante o desenvolvimento *in vitro* de *C. betacea* provocou um aumento significativo no conteúdo fenólico (tabela 6). Este aumento está correlacionado com a diminuição na altura de plantas ($R = -0,95$; $p \leq 0,01$) e com aumento da capacidade de sequestrar o radical DPPH ($R = -0,935$; $p \leq 0,01$). Por outro lado, estes reguladores (BA e AIA), dentro das concentrações utilizadas, afetaram negativamente a atividade *CAT-like* dos extratos foliares. Cabe ressaltar que não foi

detectada atividade *SOD-like* nos tratamentos controle ou na presença dos reguladores de crescimento.

Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante e determinação de polifenóis extrato de folha de plântulas micropropagadas tratadas com reguladores de crescimento (BA e AIA).

Tratamentos	DPPH [•] (IC ₅₀)	Polifenóis Totais (mg Eq. Catequina.100mL ⁻¹)	CAT-like (mmolH ₂ O ₂ .min ⁻¹)
0,0	4,40 ± 0,20 ^a	1585,00 ± 42,43 ^c	11,40 ± 0,18 ^a
0,25BA	2,53 ± 0,33 ^b	3197,50 ± 17,68 ^a	3,85± 0,10 ^d
0,5 BA	2,64 ± 0,035 ^b	2937,50± 17,68 ^{ab}	5,70 ± 0,07 ^c
0,1 AIA	3,75 ± 0,13 ^a	1727,50 ± 17,68 ^c	9,45 ± 0,07 ^b
0,25 BA+0,1 AIA	2,30 ± 0,06 ^b	3490,00 ± 21,21 ^a	1,95 ± 0,01 ^e
0,5 BA+ 0,1 AIA	2,50 ± 0,04 ^b	2610,00 ± 120,21 ^b	3,85± 0,12 ^d

Médias seguidas de letras distintas para cada parâmetro avaliados diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

BA- benziladenina; AIA ácido indolacético em mg/L.

IC₅₀- quantidade de amostra necessária para varrer 50% do radical DPPH[•]

Os dados obtidos em extratos foliares de plantas *in vitro*, sob a ação de reguladores de crescimento, mostram um aumento importante da capacidade de sequestro do radical DPPH[•], independente da presença de BA ou AIA. Tal fato pode ser atribuído ao acúmulo de compostos fenólicos com capacidade antioxidante nos cultivos *in vitro*, como forma ou mecanismo de resposta da planta à condição de estresse imposta por este sistema de cultivo.

Os compostos fenólicos atuam como mecanismos de defesa de plantas contra diversas condições de estresse, tais como ferimentos, infecções, excesso de luz, irradiação UV, entre outros (Harbone, 1998). Assim sendo, é de esperar que plantas multiplicadas *in vitro*, e submetidas a estresse por desbalanço de reguladores de crescimento apresentem aumento no conteúdo fenólico.

Aumento no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante em cultivos *in vitro* de *Salvia officinalis* foi observado por Santos-Gomes *et al.* (2003).

Cabe ressaltar que a benziladenina, assim como outras citocininas não apresentam *per se* atividade antioxidante (Brathe *et al.*, 2002), de tal forma que o aumento na capacidade de seqüestro do radical DPPH• pode ser atribuída ao aumento no conteúdo fenólico induzido direta ou indiretamente pela presença desta citocinina no meio de cultivo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

- 1) A micropropagação do tamarillo (*C. betacea*) é uma alternativa viável para a produção de mudas uniformes a partir de materiais selecionados.
- 2) Devido à elevada dominância apical de *C. betacea* a taxa de produção de brotos adventícios e desenvolvimento de gemas axilares é relativamente baixa mesmo em elevadas concentrações de citocinina.
- 3) Taxa de multiplicação da ordem de 7,5 vezes plântulas por explantes pode ser obtida por subdivisão de plântulas em segmentos nodais em meio MS sem adição de reguladores de crescimento a cada 30 dias.
- 4) Regeneração direta de plantas pode ser obtida a partir de segmentos de hipocótilos em meio MS com 0,5 mg/L de BA.
- 5) O cultivo de fragmentos foliares e caulinares em meio com 2,4-D, picloram e ANA induz altas taxas de calogênese. Entretanto, a oxidação dos explantes e calos limita a utilização desta metodologia de propagação *in vitro*.
- 6) Regeneração organogênica de plantas de *C. betacea* pode ser obtida através do cultivo de calos formados em explantes caulinares em meio sem reguladores, quando os mesmos são transferidos para meio MS com 0,5 mg/L de BA.

- 7) Extratos foliares de *C. betacea* apresentam maior atividade antioxidante do que o suco dos seus frutos, tendo assim potencial na obtenção de produtos farmacológicos.
- 8) Extratos foliares de plântulas cultivadas *in vitro* na presença de BA e AIA apresentam maior capacidade de varredura do radical DPPH• bem como maior conteúdo de polifenóis totais do que o controle.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade desse trabalho, pretende-se avaliar o comportamento *in vitro* dos reguladores de crescimento, 4-CPA, PG e PDU na micropropagação e multiplicação, analisar a influência da concentração de sacarose *in vitro* sob os mecanismos de atividade antioxidante e composição fenólica durante a multiplicação de *C. betacea in vitro*, bem como avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos foliares de *C. betacea*;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 105:121-6.

Agra, M. de F.; Nurit-Silva, K. e Berger, L.R. (2009). Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Bot. Bras.** 23:826-842.

Ammirato, P. G. V. 1983. Embryogenesis, in: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. G. V.; Yamada, Y. Handbook of plant cell culture. New York: MacMilam Publischer Company, 1:123p.

Aponte, A.; Debrot, E.; Arnal, E.; Solórzano, R. Y.; Ramos, F. (2005). Diagnóstico de las enfermedades del tomate árbol en los estados Aragua y Miranda, Venezuela. **Rev. Digital CENIAP HOY**. Maracay, Aragua, Venezuela. 9:1-5.

Arias, M. L. (2006). Recursos genéticos e melhoramento de frutales andinos: una vision conceptual. **R. CORPOICA- Ciência y Tecnologia Agropecuária.** 7:40-54.

Atkinson, R. G. & Gardner, R. C.(1993). Regeneration of transgenic tamarillo plants. **Plant Cell Rep.** 2:347-351.

- Balandrin, M.J.; Klocke, J.A. (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: Bajaj, Y.P.S., editor. "Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic plant". **Springer-Verlag**. Berlin. Heidelberg: 4:1-36
- Barghchi, M.(1986). *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand. p. 52.
- Barghchi, M.(1998). *In vitro* regeneration, plant improvement and virus elimination of tamarillo *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. **Tree Biotechn. -Towards the millennium**. 173- 185.
- Belén-Camacho, D. R.; Sánchez, E. D.; García, D.; Moreno-Álvarez, M. J. E Linares, O. (2004). Physicochemical characteristics and fatty acid composition of oil from tree tomato (*Cyphomandra betacea* Sendt) seeds var. Red and yellow. (Spanish). **Grasas y Aceites**. 55:428-433.
- Bobbio, F. O.; Bobbio, PA.; Rodriguez, A. D. (1983). Anthocyanins of the Brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. **Food Chem**. 12:189-195.
- Bohs, L. (1989). Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). **Econ. Bot**. 4:143-163.
- Bohs, L. (1991). Crossing studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and their systematic and evolutionary significance. **Am. J. Bot**. 78:1683-1693.
- Bohs, L. (1994). *Cyphomandra* (Solanaceae), Monograph 63. **New York Bot. Garden**. 175p.

- Bohs, L. (1995). Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. **Taxon** 44:583-587.
- Brathe, A., Andresen, G., Gundersen, L.L., Malterid, K.E., Rise, F. (2002). Antioxidant activity of synthetic cytokinin analogues: 6-alkynil and 6-alkenyl purines as novel 15-lipoxygenase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** 10:1581-1586.
- Canhoto, J.M.; Lopes, M.L. and Crus, G.S. (2005). Protocol of somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants: **Springer**, p. 379-389.
- Chilpa, R. R. & Diago, O. L.S. (1993). Tomate de Arbol. Etnobotânica, nº 2, Septiembre. Colômbia.
- Cohen D.; Elliot, D. (1979). Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Combined Proceedings. **Int. Plant Propagators Soc.** 29:177-179.
- Correia, S. I.; Lopes, M. L. & Canhoto, J.M. (2009). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. **Acta Hortic.** 839:157-164
- Craik, D.J.; Daly, L.N.; Plan, R.M.; Salim, A.A.; Sando, L. (2002). Structure and function of plant toxins (with emphasis on cystine knot toxins). **J. Toxicol. Toxin Rev.** 21:229-271.
- De Rosso, V. V. de & Mercadante, A.Z. (2007). HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and Carotenoids from Dovyalis and Tamarillo fruits. **J. Agric. Food Chem.** 55:9135-9141.

- Gatita, I. C. & Almeida, J. (2003). Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. **Rev. Forest. Venez.** 47:9-13.
- George, F.E. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice 2nd Edition, 1993/1996. **Ed. Exegetics Limited.** 575-1333.
- Gordon, A., Rodrigues, R. B., Marx, F., Papagiannopoulos, M. (2007). Antioxidant Capacity of Tamarillo Fruit (*Cyphomandra betacea*). http://www.tropentag.de/links/Marx_IrpXeAqz.pdf
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A.(1998). Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA/CBAB**, p. 183-260.
- Guimaraes, M. L.; Cruz, G. S. and Montezuma-Carvalho, J. (1988). Somatic embryogenesis and Plant Regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 15:161-167.
- Guimaraes, M.L.; Tomé, M.C.; Cruz, G.S. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (Tamarillo). In Y.P.S. Bajaj (Ed.). **Biotechnol. Agricult. Forestry.** Trees IV. 35:120-137.
- Hansen, C.E.; Meins, F. Jr.; Milani, A. (1985). Clonal and physiological variation in the cytokinin content of tobacco cell lines differing in cytokinin requirement and capacity for neoplastic growth. **Differentiation.** 29:1-6.

- Harbone, J.B. (1998). *Phytochemical Methods Guide to Modern Techniques in Plant Analysis* 3rd Edn., Chapman and Hall, London. 42-58.
- Hoyos, R.; Kafuri, L. (1998). Sistemas biotecnológicos para la selección acelerada de tomate árbol (*Cyphomandra betacea*) por su resistencia a antracnosis. En: Memórias del 2º Seminário de Frutales de Clima Frio Moderado. Manizales: Centro de desarrollo de frutales, 40-45.
- Hurtado, N.H; Morales, A.L.; González-Miret, M.L.; Escudero-Gilete, M. L.; Heredia, F.J. (2009) Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chem.** 117:88-93.
- Jin, C.; Chen, Q.; Sun, R.; Zhou, Q.; Liu. (2009). Eco-toxic of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. **Ecot.** 18:878-885.
- Jordan, N.; Obando, M; Iturriaga, L. Goreux, A.; Velozo, J. (1993). Organogenesis and regeneration of some Andean fruit species. **Acta Hort.** 336:279-284.
- Kou, M-C.; Yen, J-H.; Hong, J-T,.; Wang, C-l.; Lin, C-W.; Wu, M-j.(2009). *Cyphomandra betacea* Sendt. Phenolics protect LDL from oxidation an PC12 cells from oxidative stress. **LWT-Food Sci. Techn.**42:458-463.
- Larson, R.A. (1988).The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry.** 27:969-978.

- Lentini, Z. (2002). Conservación y transformación genética de Lulo (*Solanum quitoense*) y Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). In Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Tropical fruits, delicious way to improve well-being: Project IP-6 Report:1-4
- Lopes, M. L.; Ferreira, J. M.; Carloto, G.S. Cruz & Canhoto, J. M. (2000). Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In S.M. Jain *et al.* (Eds.). Somatics embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 6:433-455.
- López-Gómez, A. M.; Williams-Linera, G. & Manson, R. H. (2008). Tree species diversity and vegetation structure in shade coffee farms in Veracruz, Mexico. **Agric. Ecosyst Environ.** 124:160-172.
- Maia, J. M. (2002). Tamarillo plant regeneration through somatic embryogenesis from adult micropropagated shoots. Master thesis. University of Coimbra.
- Mentz, L. A.; De Oliveira, P. L. & Da Silva, M. V. (2000). Tipologia dos tricomas das espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **IHERINGIA.** 54:75-106
- Mertz, C.; Brat, P.; Caris-Veyrat, C.; Guanata, Z. (2009)a. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chem.**
- Mertz, C.; Gancel, A-L.; Gunata, Z.; Alter, P.; Mayer, C-D.; Vaillant, F.; Perez, A.M.; Ruales, J. & Brat, P. (2009)b. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropicals fruits. **J. Food Compos. Anal.** 22:381-387

- Mok, M. C.; Kim, S-G.; Armstrong, D. J. and Mok, D. W. (1979). Induction of Cytokinin autonomy by N,N'-difenilurea in tissue cultures of *Phaseolus lunatus* L. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 :3880-3884.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15:473-497.
- Mwithiga, G.; Mukolwe, M. I.; Shitanda, D.; Karanja, P.(2007). Evaluation of the effect of ripening on the sensory quality and properties of tamarillo (*Cyphomandra betacea*) fruits. **J. Food Eng.** 79:117-123.
- Obando, M. & Jordan, N. (2001). Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo) Cultivated *in vitro*. **Acta Hortic.** 560:429-432.
- Obando, M.; Goreux, A; & Jordan, M. (1992). *In vitro* regeneration of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo) and Andean fruit species. **AGRIS Record.** 19: 125-130.
- Ordoñez, R. M.; Ordoñez A. A. L.; Sayago, J. E.; Moreno, M. I. N.; Isla, M. I. (2006). Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides.** 27:1187-1191.
- Orrego, J.A.; González, O.T.; Sanchez, R.A.H.; Kafuri, L.A.; Londoño, G.C. (2005). Potencial de propagacion in vitro para el tomate árbol partenocárpico *Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt). **Rev. Fac. Nal. Agric.** 58:2685-2695.

- Osório, G. (1992). Advances in the culture of tree tomato (*Cyphomandra betacea*). **Acta Hort.** 310:199-205.
- Osório, C.; Franco, M. F.; Castaño, M. P.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J.; e Morales, A. L. (2007). Colour and flavour changes during osmotic dehydration of fruits. **Food Sci. Emerging Techn.** 8:353-359.
- Prohens, J.; Nuez, F. (2001). The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. **Small Fruits Review.** 1:43-68.
- Rai, M.; Pandey, S.; Ram, D.; Rai, N.; Pandey A.K. And Yadav, D.S. (2007). Plant resources of legumes and underutilized vegetables crops in India. **Acta Hort.** 752:225-230.
- Ramachandra, R S.; Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechn. Adv.** 20:101-153.
- Robles, J. E. A. & Hashimoto, J. L. J. (2006). Tomate árbol (*Cyphomandra betacea* Send). Biodiversidad y Conservacion de los Recursos Fitogenéticos Andinos. Gerencia Regional de los Recursos Naturales y conservacion del Medio Ambiente- Peru. 8 p.
- Rodrigues-Amaya, D.B.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. (2008). Updated Brazilian database of food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **J. Food Compos. Anal.** 21:445-463.
- Rufato, L; Rossi, A.; Lombardi, S.R.; Ribeiro, E; Kerten, E. (1999). Efeito de diferentes concentrações de floroglucinol no enraizamento de estacas lenhosas de duas cultivares de

pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) tratadas com AIB. **Rev. Bras. Fruticult.** 21:297-300.

Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechn. Adv.** 18:91-120

Rustaei, M.; Nazeri, S.; Ghadimzadeh, M.; Hemmaty, S. (2009). Effect of Phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Mallus domestica*). **J Agricult & Biol.** 11:193-196.

Ruxton,C.; Gardner, E.; Walker, D. (2006). Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. **J. Food Sci. Nutr.** 57:249-272.

Sabbe, S.; Verbeke, W.; Vann Damme, P. (2009). Confirmation/disconfirmation of consumers' expectations about fresh and processed tropical fruit products. **J. Food Techn.** 44:539-551

Sampietro, A. R.; Isla, M. I.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A. (2001). An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. fruits. **Plant Sci.** 160:659-667.

Santiago, E. J. A.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F.; Gomes, G. A. C. (2001) Meios de cultura: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G, 3:22-35.

- Santos-Gomes, P.C.; Seabra, R.M; Andrade, P.B; Fernandes-Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis*). **J. Plant Physiol.** 160:1025-1032.
- Sanz-Biset, J.; Campos-de-la-Cruz, J.; Rivera, M. A. E.; Cañigüeral, S. (2009). A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **J. Ethnopharmacol.**122:333-362.
- Sarcar, D. & Naik, P. S. (2000). Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*.**Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 60:139-149.
- Simões, C.M.O; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Palasso De Mello, J.C.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2004). Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed. Universidade/UFRGS. Porto Alegre. 1102p.
- Singleton, V. L. & Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticul.** 16:144-58.
- Slack, J.M. (1976). Growing tamarilos. **Agric. Gaz.** 86:2-4
- Smith, L. B. e Downs R. J. (1966). In: R. Reitz. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário “Barbosa Rodrigues”. Itajaí, SC. 1ª parte, p. 218.

- Soares, E. L. de C. & Mentz, L.A.(2006). As espécies de *Solanum* subgênero *Bassovia* seção *Pachyphylla* (= *Cyphomandra* Mart. Ex Sendtn.-Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas, Botânica. Instituto Anchieta de Pesquisas- São Leopoldo.* 57:231-254
- Srinivasan, M., Nachiapan, V. And Rajasekharan, R. (2006). Potential application of urea-derived herbicides as cytokinins in plant tissue culture. **J. Biosci.** 31:599-605.
- Stangeland, T.; Remberg, S. F. & Lye, K.A.(2009). Total antioxidant activity in Ugandan fruits and vegetables. **Food Chem.** 113:85-91.
- Thakur, A. & Kanwar J. S. (2008). Micropropagation of wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai II. Induction of rooting. **Notulae Botanicae Agrobotanici Chuj-Napoca.** 36:104-111.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2009). Auxina o hormônio do crescimento. In: *Fisiologia Vegetal.* 4ed. Porto Alegre: **Artmed.** p. 527-569.
- Tavares, V. L.; Andrade, L.; Echeverrigaray, S.(2007). Quebra de Dormência de Sementes e Cultivo *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (Cav.)Sendt. **Rev. Bras. Biociências.** Porto Alegre. 5:1161-1163.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O.H., Akpulat, A., Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chem.** 100:985-989.

- Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (1998). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Vol. 1. **EMBRAPA- SPI**. Brasília, DF.
- Tyler, V.E. (1994). Herbs of choice- The therapeutic use of phytomedicinals. Binghamton, NY: The Haworth Press.
- Vasco, C.; Ruales, J. & Kamal-Eldin, A.(2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chem.** 111:816-823.
- Vasco, C.; Avila, J.; Ruales, J.; Svanberg, U.; Kamal-Eldin, A. (2009). Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.) **J. Food Sci. Nutr.** 60: 278-288.
- Verpoorte, R.; (1998). Exploration of nature's chemo-diversity: the role of secondary metabolites as leads in drugs development. **Drug Discovery Today.** 3: 232-238.
- Xu, C.; Moore, C.H.; Fountain, D.W.; Yu, P.L. (1992) Purification and characterization of a new lectin from tamarillo (*Cyphomandra betacea*). **Plant Sci.** 81:183-189.
- Yamaguchi, T., Takamura, M., Matoba, T.C., Terão, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical – scavenging of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci., Biotechnol. Biochem.** 1201-1204.
- Zhao, G-R.; Xiang, Z.J.; Yuan, Y-J.; Guo, Z-X. (2005). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chem.** 99:767-774.