



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



**ROSEMBRANDO SOSTHENES LEITE CARVALHO FILHO**

**INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
HISTOLÓGICA DE CALOS EM *Cenostigma pyramidale* [TUL.]  
GAGNON & G.P. LEWIS**

Feira de Santana - BA

2021

**ROSEMBRANDO SOSTHENES LEITE CARVALHO FILHO**

**INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
HISTOLÓGICA DE CALOS EM *Cenostigma pyramidale* [TUL.]  
GAGNON & G.P. LEWIS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tecla dos Santos Silva

Feira de Santana - BA

2021

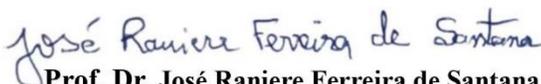
**BANCA EXAMINADORA**



**Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani**  
(Universidade Federal da Bahia -UFBA)



**Profa. Dra. Franciane Tavares Braga**  
(Universidade do Estado da Bahia -UNEB)



**Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)  
Orientador e Presidente da Banca

**Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado**

C323i Carvalho Filho, Rosembrando Sosthenes Leite

Indução, caracterização bioquímica e histológica de calos em *Cenostigma pyramidale* [TUL.] Gagnon & G.P. Lewis / Rosembrando Sosthenes Leite Carvalho Filho. –, 2021.

61f.:il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana

Coorientadora: Tecla dos Santos Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2021.

1 *Cenostigma pyramidale* [TUL.] Gagnon & G.P. Lewis. 2. *Fabaceae* - Calos. I. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. II. Silva, Tecla dos Santos, coorient.. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.736.3

Tatiane Souza Santos - Bibliotecária CRB5/1634

*À Deus e meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Deus vivo, autor da minha vida, quem me sustenta e me mantém, com seu infinito amor, todos os dias. Obrigado por cada livramento, por tamanha misericórdia, pela proteção e cuidado, sobretudo pelas bênçãos maiores que o meu merecimento.

À Mainha, MEU SINCERO MUITO OBRIGADO!! Por todo seu zelo e dedicação, por esse amor incondicional, completo, genuíno, abundante, vejo Deus em seu cuidado comigo, meu amor por ti é imensurável.

Ao meu Pai, sou grato por cada “não” que me fez encarar os estudos com seriedade e responsabilidade. OBRIGADO por todo suporte, cada atitude de estímulo e incentivo, certamente eu não seria o mesmo sem a tua presença em minha vida.

A ele, José Raniere, mais que um Orientador, um Pai. Sou eternamente grato por cada conselho, pela confiança depositada em mim e por todo respeito. É impossível não enxergar Deus nessa trajetória. A ti, Nalva e família, irmãos em Cristo Jesus, agradeço por tudo.

A ela, Tecla, minha coorientadora e “mãe científica”. Muito obrigado por tudo! você é, sem dúvidas, mais que uma parceira de trabalho, é uma grande amiga. Agradeço pelo estímulo, pelas críticas sempre construtivas, pelo cuidado ao ler meus textos, pela paciência e acima de tudo, por nunca ter me deixado na mão. Deus te abençoe!

A Jozilene Ferreira, minha primeira experiência em orientação de Iniciação Científica, muito grato por toda sua ajuda e empenho.

A turma boa do LCTV-UEFS pelo respeito, convivência e colaboração que sempre conservou a paz e o bem-estar do laboratório.

Aos amigos da vida e que o meio acadêmico me trouxe, Maiana, César, Waley, Vivaldo, Aslany, Simônica, Addla, Tejeda, Rubens, Mauricio, Dinah, Iêda os quais estiveram sempre mais perto, sempre em sintonia e torcendo direta ou indiretamente pelo meu sucesso. Contem sempre comigo!

Ao amigo Uasley por todas as conversas e por sempre se colocar à disposição para ajudar em qualquer circunstância, como nas análises bioquímicas que, sem sua ajuda e da colega Iana, jamais eu teria conseguido concluí-las em tempo hábil.

A querida Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa-Catarina pelo amparo, esforço e paciência, elementos essenciais para que as análises morfohistológicas (considerando todas as dificuldades impostas pela pandemia do novo coronavírus) fossem realizadas. Além disso, agradeço imensamente a sua aluna de Doutorado, a Yrexam Ribeiro, pela grande ajuda nas análises e todo apoio.

À Embrapa Semiárido (Unidade Petrolina – PE), que por meio da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Barbara França Dantas e da aluna de Mestrado Simônica Souza, concedeu um número significativo de sementes para realização deste trabalho.

Aos funcionários da Unidade Experimental Horto Florestal, pelo trabalho desenvolvido que melhora a nossa rotina enquanto pesquisadores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa e todo fomento concedido.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

“Nunca é tarde demais ou cedo demais para ser quem você quer ser. Não há limite de tempo. Comece quando quiser. Mude ou continue sendo a mesma pessoa. Não há regras para isso. Você pode tirar o máximo proveito ou o mínimo. Espero que tire o máximo. Espero que veja coisas surpreendentes. Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes. Espero que conheça pessoas com um ponto de vista diferente. Espero que tenha uma vida da qual se orgulhe. E se não se orgulhar dela, espero que encontre forças para começar tudo de novo.”  
(O Curioso Caso de Benjamin Button)

## RESUMO

*Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis, é uma árvore pertencente à família Fabaceae, que possui utilização madeireira e medicinal; em virtude da exploração de seus recursos naturais, pode resultar em via de extinção. Esse trabalho objetivou estudar a calogênese da catingueira, bem como analisar bioquímica e histologicamente os calos obtidos visando identificar potencial embriogênico. A indução de calos ocorreu de duas formas distintas, na primeira, explantes foliolares foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinadas com concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e glutamina. Após 45 dias de cultivo foram avaliadas: porcentagem dos explantes que formaram calos, massa fresca dos explantes com calos, porcentagem da área do explante recoberta por calos, coloração e textura. Na segunda, explantes foliolares foram submetidos a tratamento com pulso auxínico em meio MS líquido contendo ou não 210 µM de 2,4-D na ausência e presença de 7,0 µM de 2,4-D, 5,0 µM de BAP e 0,68 mM de glutamina. Para a curva de crescimento, pesou-se a massa fresca dos explantes com e sem calos até o 77º dia de cultivo, em intervalos de 7 dias, totalizando 12 períodos. Em cada período foram coletadas amostras para análise histomorfológica e determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR), sacarose e açúcares solúveis totais (AST). Observou-se a indução de calos em *C. pyramidale* utilizando segmentos de foliólulos, tanto em pulso auxínico quanto em uso contínuo de BAP, 2,4-D e glutamina em meio de cultura. As análises histomorfológicas revelaram a presença de células com características semelhantes àquelas que possuem potencial meristemático no experimento de calogênese com BAP, 2,4-D e glutamina, ao passo que o experimento de estresse auxínico não foi eficiente para tanto. A curva de crescimento apresentou comportamento sigmoide com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio. O conteúdo de AR foi decrescente sendo detectado até o 21º dia da curva de crescimento. O conteúdo de AST e sacarose apresentaram um pico no fim da fase lag e degradação na fase exponencial com estabilidade e leve redução até a fase de declínio.

**Palavras-chave:** Catingueira. Pulso auxínico. Cultivo *in vitro*.

## ABSTRACT

*Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis, is a tree belonging to the Fabaceae family, which has medicinal and timber uses. This work aimed to study the callogenesis of catingueira, as well as to analyze biochemically and histologically the callus obtained in order to identify embryogenic potential. Callus induction occurred in two different ways. In the first, leaf explants were inoculated in MS culture medium supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) combined with concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and glutamine. After 45 days of culture, the following were evaluated: percentage of explants that formed callus, fresh mass of explants with callus, percentage of explant area covered by callus, coloration and texture. In the second, leaf explants were subjected to auxin pulse treatment in liquid MS medium containing or not 210  $\mu\text{M}$  of 2,4-D in the absence and presence of 7.0  $\mu\text{M}$  of 2,4-D, 5.0  $\mu\text{M}$  of BAP, and 0.68 mM of glutamine. For the growth curve, the fresh mass of explants with and without callus up to day 77 of culture was weighed at 7-day intervals, totaling 12 periods. In each period, samples were collected for histomorphological analysis and determination of the content of reducing sugars (RA), sucrose and total soluble sugars (TSA). Callus induction was observed in *C. pyramidale* using foliol segments, both in auxin pulse and in continuous use of BAP, 2,4-D and glutamine in culture medium. The histomorphological analyses revealed the presence of cells with characteristics similar to those with meristematic potential in the callogenesis experiment with BAP, 2,4-D and glutamine, while the auxin stress experiment was not efficient to do so. The growth curve showed sigmoidal behavior with five distinct phases: lag, exponential, linear, deceleration, and decline. The RA content was decreasing and was detected until day 21 of the growth curve. The content of TSA and sucrose showed a peak at the end of the lag phase and degradation in the exponential phase with stability and slight reduction until the decline phase.

**Keywords:** Catingueira. Auxin pulse. *In vitro* cultivation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Caracterização botânica da *Cenostigma pyramidale* [Tul.]. A – Exemplar adulto (arbóreo) na estação chuvosa; B – Frutos (vagens) imaturos; C – Sementes. Fonte: Silva (2012), adaptado de <http://www.cnip.org.br/bdnp/fotosdb/1019613156.JPG>. ..... 18
- Figura 2:** Explantes responsivos para formação de calos (ERFC%) obtidos a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>, \*\*, \*, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021. .... 30
- Figura 3:** Massa fresca dos explantes com calos (MFEC) obtida a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>, \*\*, \*, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021. .... 33
- Figura 4:** Área do explante recoberta por calos (ARC%) obtida a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>, \*\*, \*, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021. .... 36
- Figura 5:** Diversidade de cores relacionadas aos tratamentos de indução à embriogênese somática em calos de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio MS, acrescido de diferentes concentrações da citocinina BAP, da auxina 2,4-D e da Glutamina. Feira de Santana - BA, 2021. .... 37
- Figura 6:** Explantes que formaram calos (%) de acordo aos respectivos períodos (0, 24, 48 e 72 horas) de pulso auxínico em segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] utilizando meio de cultura MS na presença e/ou ausência da combinação 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina após 56 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula comparam as horas de pulso auxínico e maiúscula quanto a presença ou ausência de reguladores em relação ao período de pulso, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Feira de Santana - BA, 2021. .... 41
- Figura 7:** Aspectos morfológicos dos calos submetidos aos diferentes tratamentos de pulso auxínico (0, 24, 48 e 72h) em meio isento de reguladores e meio contendo a combinação de reguladores resultante do melhor tratamento obtido no experimento anterior utilizando explantes foliolares de *C. pyramidale* aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 25 µM. Feira de Santana - BA, 2021. .... 43
- Figura 8:** Aspectos histológicos de amostras de calos submetidos aos diferentes tratamentos de pulso auxínico partindo de explantes foliolares de *C. pyramidale* aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 100 µM. Feira de Santana - BA, 2021. .... 44
- Figura 9:** Oxidação (%) em calos de acordo aos respectivos períodos (0, 24, 48 e 72 horas) de pulso auxínico em segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] utilizando meio de cultura MS na presença e/ou ausência da combinação 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,68 mM de glutamina após 56 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula

comparam as horas de pulso auxínico e maiúscula quanto a presença ou ausência de reguladores em relação ao período de pulso, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Feira de Santana - BA, 2021. .... 45

**Figura 10:** Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] inoculados em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina durante 77 dias de incubação exibindo distintas fases: I – lag; II – exponencial; III – linear; IV – desaceleração e V – declínio. Feira de Santana - BA, 2021. . 46

**Figura 11:** Detalhes anatômicos do corte transversal do explante foliar de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] antes da inoculação. Barra = 100 µM. Feira de Santana - BA, 2021. .... 48

**Figura 12:** Aspectos histológicos, em corte transversal, dos calos ao 7º dia de crescimento, oriundos de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina. A = objetiva de 20x; B= objetiva de 40x. Barra = 100 µM Feira de Santana - BA, 2021. .... 49

**Figura 13:** Aspectos histológicos dos calos, evidenciando (em vermelho) a presença de células com características meristemáticas ao 21º (A), 28º (B), 35º (C) e 42º (D) dia de incubação, oriundos de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina. Barra = 100 µM Feira de Santana - BA, 2021. .... 50

**Figura 14:** Conteúdo de carboidratos dos calos de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] formados a partir de explantes foliolares inoculados em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina, durante 77 dias de incubação (média ± desvio padrão, n= 3). Feira de Santana - BA, 2021. .... 52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resumo dos tratamentos de pulso auxínico onde o meio contendo reguladores refere-se a presença de 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,68 mM de glutamina enquanto o meio sem reguladores contém apenas, sais, vitaminas e sacarose. Feira de Santana-BA, 2021. .... 27
- Tabela 2:** Resumo da análise de variância para explantes responsivos para a formação de calos (ERFC%), massa fresca dos explantes com calos (MFEC) e área do explante recoberta por calos (ARC%) aos 45 dias, obtidos a partir de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] submetidas a diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzilaminopurina (BAP) e da Glutamina (GLUT). Feira de Santana-BA, 2021. .... 29
- Tabela 3:** Coloração dos calos, porcentagem de calos friáveis (%CF), calos compactos (%CC) e calos com partes friáveis e compactas (%CFC) obtidos a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações da citocinina BAP, da auxina 2,4-D e da Glutamina. .... 38
- Tabela 4:** Resumo da análise de variância para explantes responsivos para a formação de calos (ERFC%) e oxidação (OXI%), aos 56 dias de incubação, relacionados ao pulso de 2,4-D durante 0, 24, 48 e 72 horas na presença e/ou ausência de 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina, em explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.]. Feira de Santana-BA, 2021. .... 40

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1 A espécie <i>Cenostigma pyramidale</i> [Tul.] Gagnon &amp; G.P. Lewis</b> .....	17
<b>2.2 Cultura de tecidos vegetais</b> .....	18
<b>2.3 Curva de crescimento e metabolismo de carboidratos em calos</b> .....	21
<b>2.4 Estudos histomorfológicos e potencial embriogênico em cultura de calos</b> .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1 Local de realização dos experimentos</b> .....	24
<b>3.2 Germinação <i>in vitro</i></b> .....	24
<b>3.3 Calogênese em explantes foliolares</b> .....	25
<b>3.3.1 Efeito da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da Glutamina</b> .....	25
<b>3.3.2 Pulso auxínico com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)</b> .....	26
<b>3.3.2.1 Indução de calos via pulso auxínico</b> .....	26
<b>3.3.2.2 Transferência do material vegetal</b> .....	26
<b>3.4 Curva de crescimento de calos</b> .....	27
<b>3.5 Análises do conteúdo de carboidrato</b> .....	27
<b>3.6 Análises histomorfológicas dos calos</b> .....	28
<b>3.7 Análise Estatística</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

*Cenostigma pyramidale* [Tul.] é uma espécie lenhosa, arbórea, pertencente ao bioma Caatinga, cuja vegetação inclui uma diversidade de plantas de usos múltiplos; sendo que, neste caso, a característica forrageira se destaca pelo seu elevado valor nutricional na alimentação de ruminantes (FRANÇA et al., 2020). Seu potencial ainda vai além, principalmente o uso de sua madeira, resultando na retirada da árvore, que de alguma maneira pode impedir sua reprodução natural, ocasionando problemas com a propagação, aproximando-a do risco de extinção (MAIA, 2012).

Diante disso, faz-se necessário a elaboração de estratégias para multiplicação, conservação, manejo e exploração de seus recursos de forma sustentável; assim, surge a alternativa de introduzir técnicas como a cultura de tecidos de plantas, importante aliada no âmbito da produção de material vegetal em larga escala e em qualquer época do ano (COPELAND, 2015).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais, tem-se a micropropagação, que pode ser desenvolvida por duas vias: organogênese ou embriogênese somática, as quais ocorrem diretamente do explante ou indiretamente, por intermédio da formação de aglomerados de células e tecidos, que se originam da intensa divisão das células do explante, sendo comumente chamados de calos (MERCIER, 2008). A embriogênese somática é aquela em que células somáticas se desenvolvem em embriões sem que haja a fusão de gametas (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014), o que, segundo Grandó et al. (2013), pode ser considerada vantajosa em relação a regeneração por organogênese, devido a possibilidade de elevadas taxas de multiplicação e o desenvolvimento de plantas com maior integridade genética. Esse processo ocorrendo por via indireta (passando pela fase de calo) inicia-se com a calogênese e em seguida ocorre a formação de embriões somáticos a partir dos calos (ALVES et al., 2018); os quais terão a presença dos meristemas radiculares e apicais simultaneamente, resultando numa planta completa (CAMPOS et al., 2009).

Ao longo do processo de embriogênese somática é fundamental que haja a presença dos reguladores de crescimento para que ocorra a desdiferenciação dos tecidos durante a formação dos calos e diferenciação para formação de embriões somáticos (VILELA et al., 2019). As auxinas apresentam como principais efeitos fisiológicos o crescimento celular vegetal e o enraizamento (MERCIER, 2008), ao passo que as citocininas são promotoras da divisão celular, sendo intimamente ligadas à biotecnologia de plantas (PERES; KERBAUY, 2008).

A auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que foi amplamente aceita como o principal fator de controle da embriogênese (SHARMA; BRYAN; MILLAM, 2007) é, por consequência, a mais utilizada; inclusive, altas doses de auxina podem ser consideradas como estímulo inicial na aquisição de competência celular (MOURA et al., 2019), entretanto, concentrações elevadas de auxina em contato com o tecido vegetal pode afetar a morfologia das plantas, causando problemas como fasciação, distorção estrutural ou variação somaclonal (FAISAL et al., 2012). Assim, visando a obtenção de embriões somáticos sem que haja exposição contínua à auxina, Sharma, Bryan e Millam (2007) sugerem o uso de tratamentos com pulso auxínico, como uma maneira de minimizar o contato contínuo do tecido com elevadas doses do referido regulador.

Por outro lado, entre as citocininas, destacam-se a 6-benzilaminopurina (BAP) e o Thidiazuron (TDZ), as quais são promotoras de divisão e diferenciação celular, estimulando a proliferação da grande maioria de tipos de células, formando massas celulares quando em concentrações adequadas (PERES; KERBAUY, 2008). Além dos reguladores citados, existem algumas evidências na literatura de que a glutamina, definida como uma forma de nitrogênio orgânico prontamente assimilável, estaria provavelmente relacionada à indução do processo embriogênico somático, considerando que os aminoácidos estão presentes em todas as etapas desse processo, desempenhando as mais variadas funções (BARTOS, 2018). Pelegrini et al. (2013) relatam que o uso de aminoácidos no processo de embriogênese somática tem sido promissor, considerando a importância do nitrogênio na incorporação à esqueletos de carbono na síntese de proteínas.

Durante o crescimento *in vitro*, o calo passa por diferentes fases e alterações histológicas que estão relacionadas com o posicionamento e atividade das células competentes, essas informações obtidas através de análises morfohistológicas são, normalmente, requisitos básicos para o estudo da embriogênese somática (MACIEL et al., 2010), assim como a caracterização bioquímica dos calos, que por sua vez, pode contribuir na elucidação de processos desencadeados pela morfogênese dos tecidos sob as condições de cultivo *in vitro*, possibilitando inferir sobre o desenvolvimento dos calos (RODRIGUES et al., 2020). Quanto as fases de crescimento, sua identificação e classificação são fundamentais, não apenas para estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um novo meio ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares (NOGUEIRA et al., 2008); mas também, para que seja possível realizar associações com as alterações histomorfológicas, por exemplo.

Desse modo, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da auxina 2,4-D, da citocinina BAP e da glutamina na indução de calos em *C. pyramidale* visando identificar o seu potencial embriogênico por meio de estudos morfohistológicos, bem como compreender a dinâmica do conteúdo de carboidratos ao longo do período de cultivo *in vitro*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A espécie *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis

*Cenostigma pyramidale* [Tul.] é uma espécie da família Fabaceae, facilmente encontrada pelo nordeste brasileiro, cujo bioma predominante é a Caatinga (COPELAND, 2015). Este bioma ocupa cerca de 11% do país, possuindo uma área superior a 826.411 km<sup>2</sup> (BRASIL, 2017), sendo que, aproximadamente 30% da flora descrita para este bioma pertence à família Fabaceae (LOIOLA et al., 2010). A *C. pyramidale* pode ser identificada por nomes que fazem referência ao odor desagradável de suas folhas e variam de acordo com a região, dentre eles: catingueira, catinga-de-porco, catingueira-das-folhas-largas, canela-de-velho, catingueira-verdadeira, catinga-de-mulata (MATIAS; SILVA; DANTAS, 2017).

A catingueira é uma árvore de porte médio (Figura 1A), sem espinhos, que em geral possui 4-6 m de altura, podendo atingir até 12 m, apresentando copa aberta e irregular; a casca das árvores adultas da catingueira é de cor cinza-claro, às vezes levemente castanho, suas folhas são bipinadas, com 5-11 folíolos alternos ou opostos; as flores são amarelas, dispostas em racimos curtos e o fruto é uma vagem achatada (Figura 1B), pontada, de 8-11 cm de comprimento e 2 cm de largura, de cor castanho claro, composto por 5-7 sementes, as quais (Figura 1C), através da deiscência violenta da vagem, são arremessadas a longas distâncias (MAIA, 2012).

Esta espécie é vista como uma fonte significativa de recursos, entre eles os potenciais forrageiro, madeireiro e medicinal (LIMA et al., 2014; MATIAS; SILVA; DANTAS, 2017; MAIA, 2012); além de possuir boa adaptação nos mais diversos tipos de solo, principalmente em ambientes onde o solo é de textura pedregosa e árido (MAIA, 2012). Teixeira et al. (2007) relatam sua resistência a ambientes de baixa disponibilidade hídrica; o que, inclusive, pode torná-la apropriada para uso em projetos de recuperação de áreas degradadas (QUEIROZ, 2009).



**Figura 1:** Caracterização botânica da *Cenostigma pyramidale* [Tul.]. A – Exemplar adulto (arbóreo) na estação chuvosa; B – Frutos (vagens) imaturos; C – Sementes. Fonte: Silva (2012), adaptado de <http://www.cnip.org.br/bdpm/fotosdb/1019613156.JPG>.

## 2.2 Cultura de tecidos vegetais

Os estudos que envolvem o cultivo de plantas *in vitro* se distribuem ao longo das últimas décadas sob as mais variadas perspectivas. Desde o início, ainda nos primeiros ensaios de Gottlieb Haberlandt (1902), ou até nas descobertas de Philip White (1934), além de outros pesquisadores, já era possível mensurar o potencial desta ciência através de diversas descobertas, dentre elas, os efeitos de sais inorgânicos, sacarose e extrato de levedura na regeneração de raízes; o processo de dediferenciação celular; as primeiras suposições sobre a relação auxina / citocinina (CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018), assuntos estes que se tornaram comuns para a literatura moderna.

Objetivamente, a cultura de tecidos de plantas possibilita o cultivo de organismos vegetais em um ambiente livre da presença de patógenos, além de fornecer à planta uma fonte de carbono, minerais essenciais e vitaminas, componentes que são considerados vitais; além disso, outros elementos como temperatura e luminosidade são disponibilizados em frequência e intensidade controladas, estabelecendo dessa maneira, ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento esperado (PHILLIPS; GARDA, 2019).

Em teoria, as condições estabelecidas em salas de cultivo *in vitro* possuem antes de qualquer

outro objetivo, o de simular o ambiente natural. Dessa maneira, tudo que pode ser classificado como artificial possui fundamentos; a começar pelo meio de cultura, que por sua vez, substitui o solo e além da função de sustentação para as plantas (meio semi-sólido), é onde se encontram os elementos essenciais para os vegetais (SÁ et al., 2018). Dentre as diversas formulações de meios de cultura existentes, os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (Woody Plant Medium) de Lloyd e McCown (1980) se destacam como os mais utilizados; o primeiro, muito mais concentrado, e o último possui composição mais diluída, além de ser recomendado especificamente para espécies lenhosas (BERTOZZO; MACHADO, 2010).

De forma geral, o meio de cultura é composto por água, macronutrientes inorgânicos (N, K, Ca, Mg, P, S, Si), micronutrientes inorgânicos (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo), vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina, tiamina), aminoácidos (tirosina, L-arginina, L-serina), fontes de nitrogênio orgânico (glicina; inositol), carboidratos (sacarose), agentes solidificantes e, quando necessário, fitoreguladores (auxinas, citocininas, giberelinas) (SÁ et al., 2018).

Outro fator muito importante e simulado em cultivo *in vitro* de plantas é a luminosidade, elemento determinante no desenvolvimento das plantas, sendo caracterizada pelo fotoperíodo, irradiância e composição espectral (OLIVEIRA et al., 2019). Ao longo dos últimos anos, o fornecimento de luz em laboratórios de cultura de tecidos vegetais evoluiu substancialmente; estudos com bananeira (ROCHA et al., 2017), cana de açúcar (FERREIRA et al., 2016), damasco (MITROFANOVA et al., 2019), clones híbridos de *Corymbia* (SOUZA et al., 2018) e outras espécies, evidenciam a evolução neste aspecto e os efeitos positivos da substituição, por exemplo, das lâmpadas fluorescentes pelas lâmpadas LED [Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)] em relação as respostas fotomorfogênicas durante a micropropagação (ROCHA et al., 2017).

Entretanto, o sucesso no cultivo *in vitro* de plantas não depende apenas do meio de cultura adequado para a espécie em estudo, uso de reguladores de crescimento, diferentes fontes de carbono ou de ajustes nas condições de incubação (fotoperíodo e temperatura); é necessário considerar a indesejável presença de eventuais contaminações microbianas, o que, de alguma maneira, pode comprometer as fases da micropropagação (CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018). Dentre os fatores que podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos e, de alguma maneira, prejudicar o cultivo de plantas *in vitro*, estão: a baixa eficiência de alguns métodos de assepsia do material vegetal, esterilização do meio de cultura (VARGAS et al., 2016), aumento das trocas gasosas *in vitro* pelo fluxo de CO<sub>2</sub> a depender do tipo de tampa utilizada nos frascos de

cultivo e até na vedação dos tubos de ensaio (CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018) ou o próprio cultivo com sacarose que, sugere inclusive, a adoção da micropropagação fotoautotrófica, eliminando o uso desta fonte de energia (FLORES et al., 2015).

O processo de micropropagação de uma espécie, geralmente é requerido quando métodos convencionais de propagação não apresentam eficácia (PHILLIPS; GARDA, 2019), assim, segundo Ornellas et al. (2019), é possível estabelecer um sistema de produção de mudas em larga escala com espaço reduzido, além de possibilitar a obtenção de plantas livres de doenças e de alta qualidade. Cardoso, Gerald e Silva (2018) afirmam que a eficiência da micropropagação permitiu ao longo dos últimos cem anos, a expansão e acesso à plantas de alto vigor para produtores de diferentes contextos geográficos e econômicos, contribuindo efetivamente para um crescimento agrícola significativo.

Neste sentido, os estudos que envolvem a cultura tecidual de plantas, através da micropropagação, possuem interesses diversos, que vão desde as espécies ameaçadas de extinção, como a bromélia *Sincoraea mucugensis* (LIMA; BRITO; SANTANA, 2020), àquelas que possuem curto ciclo reprodutivo e susceptibilidade dos seus frutos às pragas, como a *Physalis peruviana* L. (MASCARENHAS; SANTANA; BRITO, 2019), até o âmbito da exploração medicinal, como o boldo-da-bahia (*Vernonia condensata* Baker) (ALMEIDA et al., 2020), visando a geração de germoplasma competitivo e adaptado. Com a catingueira, alguns estudos já foram realizados, como a avaliação do efeito da citocinina 2ip (isopenteniladenina) na multiplicação *in vitro* (SOUZA et al., 2015), estudo sobre conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento (SILVA et al., 2019) e até o estabelecimento de protocolos para indução de calos *in vitro* (GOMES-COPELAND et al., 2017). Independentemente da finalidade, é prudente ressaltar que, embora nem todos os estudos tenham como premissa a execução de todas as etapas da micropropagação, nela existem quatro fases distintas, começando pelo estabelecimento, seguido pela multiplicação, enraizamento e, por fim, aclimatização.

Na micropropagação, o uso de reguladores de crescimento vegetal é, quase sempre, necessário; a manipulação do meio de cultura com a suplementação de fitorreguladores depende dos objetivos de cada estudo e, entre os mais utilizados, estão as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico (PHILLIPS; GARDA, 2019). Todavia, auxinas e citocininas são dois dos hormônios mais influentes no desenvolvimento vegetal, uma vez que estes reguladores estão diretamente relacionados a processos como o desenvolvimento de raízes laterais,

padrão de divisão celular e dominância apical (MURARO et al., 2013).

O uso de auxinas e citocininas está diretamente ligado às vias de propagação *in vitro*, sendo elas a organogênese e a embriogênese, as quais ocorrem tanto diretamente do explante quanto precedidas pela formação de calos. Lima, Brito e Santana (2020) relataram que há viabilidade na micropropagação via organogênese direta em *Sincoraea mucugensis*. Por outro lado, o uso de diferentes citocininas na organogênese *in vitro* do flamboyant (*Delonix regia*) foi essencial na obtenção de respostas morfogenéticas, evidenciando a importância deste regulador na multiplicação *in vitro* (COSTA et al., 2019).

A embriogênese somática surge como uma outra estratégia de micropropagação eficiente, como visto em estudos com protocormos do híbrido *Phalaenopsis classic* Spotted Pink, nos quais embriões somáticos obtidos apresentaram competência em transformar-se em plantas, apresentando os órgãos vegetativos com características morfológicas satisfatórias (PEREIRA et al., 2019). Em estudos com material vegetal de natureza lenhosa (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) como a *C. pyramidale*, foi possível, via embriogênese somática indireta (passando pela fase de calos) a indução de pró-embriões somáticos usando cotilédones como fonte de explantes (MOURA et al., 2017). A formação de calos pode ocorrer através de diferentes explantes (raízes, caules, folhas, flores etc.), iniciando pela indução (onde acontece a preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular), divisão propriamente dita (na qual as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, iniciando pelas periféricas e posteriormente ocupando a região central do explante) e, por fim, a desdiferenciação, quando o tecido perde sua identidade histológica, as células tornam-se maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão diminui e então ocorre o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular (SOUZA; RESCAROLLI; NUNES, 2018).

### **2.3 Curva de crescimento de calos**

Durante o cultivo *in vitro*, a importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. A partir desse estudo, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um novo meio ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (NOGUEIRA et al., 2008).

Com a determinação das fases que definem o crescimento e desenvolvimento dos calos (lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio) é possível estudar o índice mitótico e torna possível estipular o intervalo médio dos subcultivos (STEIN et al., 2010).

É comum entre a maioria das espécies já estudadas, verificar o chamado comportamento sigmoidal da curva de crescimento, entretanto nem sempre contendo as seis fases anteriormente apresentadas. Silva et al. (2020) em estudos de calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. relataram a presença de apenas cinco fases (lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária) durante o período de 56 dias. Em detalhes, a primeira fase (fase lag) se caracteriza como o período de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Neste momento é marcante a mobilização de metabólitos primários com a síntese de proteínas e compostos específicos. A fase exponencial é biossintética, ou seja, acontece um aumento no crescimento dos calos devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. Na fase linear há diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular. Em seguida inicia-se a fase de desaceleração, período ideal para transferência das culturas de células para outro meio, momento em que deve ocorrer a repicagem dos calos em função da diminuição dos nutrientes no meio de cultura. Na fase estacionária acontece a maior produção de metabólitos secundários e, por fim, a fase de declínio encerra a curva de crescimento com a perda de peso das células devido à morte celular (CASTRO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2008).

Os resultados obtidos ao se estabelecer a curva de crescimento de calos variam de acordo a espécie, como descrito no estudo de calogênese em *Lavandula angustifolia* onde Bona, Santos e Biasi (2012) verificaram que os calos atingiram a fase estacionária em três semanas de cultivo, evidenciando a necessidade de troca de meio de cultura a cada três semanas, aproximadamente, a fim de manter o crescimento logarítmico das células. Já Nogueira et al. (2008), verificaram que em 90 dias de cultivo houve crescimento exponencial dos calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), depois disso, uma diminuição, coincidente com o início do processo de desaceleração.

Além disso, estudos bioquímicos feitos com amostras de calos para identificar alterações associadas ao metabolismo primário, como avaliação da dinâmica no conteúdo de carboidrato, por exemplo, podem revelar a reserva prontamente disponível ao seu crescimento, auxiliar no próprio processo de cultivo *in vitro* e possui várias aplicações em estudos fisiológicos, já que os carboidratos fornecem esqueletos de carbono e energia para a biossíntese de compostos orgânicos

envolvidos no metabolismo celular e, o conhecimento dos níveis destes, durante o desenvolvimento do calos, contribui significativamente para ampliação do conhecimento no âmbito da fisiologia morfogênética (SANTOS et al., 2010).

#### **2.4 Estudos histomorfológicos e potencial embriogênico em cultura de calos**

A análise histomorfológica é uma ferramenta de importante influência na otimização e validação de protocolos de organogênese e embriogênese somática. Assim, visando compreender aspectos estruturais envolvidos em culturas embriogênicas, estudos citológicos buscam mostrar as diferenças nas organizações celulares e os padrões que compreendem essa via de regeneração entre as espécies de plantas (SILVEIRA et al., 2013; VALE et al., 2014; STEINER et al., 2016).

Em cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), por exemplo, Silveira et al. (2013) verificaram, através de ferramentas de análise histomorfológica, as principais diferenças entre os calos que podem ser considerados embriogênicos e aqueles não embriogênicos. Calos formados por agrupamentos pequenos e isodiamétricos de células, que contêm núcleos proeminentes e citoplasma denso, sendo estes aglomerados estruturas redondas e delimitadas por uma camada de células organizadas, são considerados embriogênicos. Enquanto os calos não-embriogênicos apresentam aspecto translúcido com células grandes, altamente vacuoladas, alongadas e dispersas, as quais não formam estruturas organizadas como as observadas em calos embriogênicos.

O estudo anatômico em massas celulares para detecção de potencial embriogênico é extremamente necessário e conclusivo, possibilitando confirmar e monitorar a evolução das células nas diferentes fases que caracterizam a embriogênese somática. Em estudos com *Vernonia condensata*, Rodrigues et al. (2020) verificaram, através do método histológico e microscopia eletrônica de varredura, que as células dos segmentos foliolares e internodais nos meios de cultura utilizados foram capazes de desdiferenciar-se, modificando suas estruturas embrionárias.

Da mesma forma, Moura et al. (2019) avaliaram, através de cortes anatômicos e análise histoquímica, o efeito de diferentes intervalos de pulso de auxina na indução de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e descreveram o comportamento de calos embriogênicos sob o efeito do estresse auxínico.

Os calos podem ser caracterizados de acordo com aspectos morfológicos e citológicos por meio de análises citoquímicas, de acordo com o protocolo de histoquímica Leica® modificado, permitindo diferenciar células embriogênicas e não embriogênicas, como feito em explantes radiculares de dendezeiro onde a análise histológica evidenciou o desenvolvimento primário de

tecidos meristemáticos durante a formação de embriões somáticos (VILELA et al., 2019). Já na catingueira, que também é uma espécie lenhosa, não existem relatos de estudos com essa finalidade.

É importante ressaltar a relevância da suplementação do meio de cultura com nitrogênio, considerando que este elemento está associado ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese, o qual pode ser fornecido através de aminoácidos como a glutamina (WERNER et al., 2010). Neste sentido, Pelegrini et al. (2013) verificaram que o uso desta fonte de nitrogênio resultou em formação de embriões no estágio globular, quando utilizada em *Ocotea porosa* uma espécie arbórea pertencente a floresta ombrófila mista.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização dos experimentos**

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e as análises bioquímicas no Laboratório de Germinação (LAGER), os quais estão alocados na Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF) pertencentes à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os estudos de anatomia dos calos foram feitos no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

#### **3.2 Germinação *in vitro***

Foram utilizadas sementes de *C. pyramidale* coletadas no distrito de Juremal (Latitude 9°43'51.12''Sul e Longitude 40°21'02.52''Oeste) que está inserido no domínio territorial do município de Juazeiro – BA, as quais foram cedidas pela Embrapa Semiárido localizada no município de Petrolina - BA. As sementes foram lavadas com água e detergente neutro, permanecendo em água corrente por 10 minutos. Em seguida foi realizada a desinfestação em etanol a 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) com duas gotas de detergente neutro por 10 minutos e posteriormente, as sementes foram submetidas à lavagem por três vezes em água destilada estéril. Após este processo, foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) de Lloyd & McCown (1980), suplementado com 87,64 mM de sacarose e gelificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem a uma temperatura de 121° C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com

temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 14 horas e radiação fotossintética ativa de  $60 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . As plantas provenientes da germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de material vegetal asséptico após 45 dias.

### 3.3 Calogênese em explantes foliares

#### 3.3.1 Efeito da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da Glutamina

Segmentos foliares ( $\pm 0,5 \text{ cm}^2$ ), obtidos a partir dos folíolos de *C. pyramidale*, foram excisados nas extremidades longitudinais e posteriormente imersos em ácido ascórbico (1,14 mM) por 10 minutos. Em seguida, os explantes foram inoculados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0  $\mu\text{M}$ ), combinadas com concentrações de BAP (0,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) e glutamina (0,0; 0,34 e 0,68 mM). O meio de cultura foi acrescido com 87,64 mM de sacarose e gelificado com  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar, tendo o seu pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial  $4 \times 3 \times 3$  (concentrações de 2,4-D x concentrações de BAP x concentrações de glutamina), totalizando 36 tratamentos, cada um constituído por cinco repetições (placas), sendo cada repetição composta por 5 unidades experimentais (cinco explantes). As culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de  $25 \pm 3^\circ \text{C}$ , na ausência de luz. Após 45 dias de cultivo foram avaliadas: porcentagem dos explantes que formaram calos (ERFC%), massa fresca dos explantes com calos (MFEC), porcentagem da área do explante recoberta por calos (ARC%) (de acordo com a seguinte escala visual: 0% – ausência de calos, aproximadamente 25%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75% e 100% da área do explante recoberta por calos), coloração (utilizando padrões determinados pela RHS mini colour chart onde cada cor possui um código padrão (Royal Horticultural Society, 2005)) e textura (percentual de calos friáveis, calos compactos ou calos com partes friáveis e compactas simultaneamente).

### 3.3.2 Pulso auxínico com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

#### 3.3.2.1 Indução de calos via pulso auxínico

Nesta primeira etapa, explantes foliolares obtidos a partir dos foliólulos de *C. pyramidale* foram inoculados em balões Erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido, acrescido com 87,64 mM de sacarose e 210  $\mu$ M de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e pH ajustados para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121° C por 15 minutos. Os erlenmeyers continham 10 explantes cada, os quais foram mantidos em sala de crescimento por 24, 48 e 72 horas, em pulso de auxina, na ausência de luz, a uma temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 60 rpm para promover a oxigenação no meio com pulso de auxina. A partir desse material, foi realizada a etapa seguinte.

#### 3.3.2.2 Transferência do material vegetal

O material que estava no meio de tratamento pulso foi transferido para dois diferentes tipos de meio. O primeiro (contendo reguladores e glutamina com concentrações definidas pelo melhor tratamento obtido no item 3.3.1), meio MS semissólido, suplementado com 7,0  $\mu$ M de 2,4-D, 5,0  $\mu$ M de BAP e 0,68 mM de glutamina. O segundo (na ausência de reguladores e glutamina), meio MS semissólido apenas contendo sais e vitaminas. Ambos foram acrescidos de 87,64 mM de sacarose e gelificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar em frascos (60 x 15 mm) com volume de 30 mL cada. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e em seguida o mesmo foi autoclavado a 121° C por 15 minutos.

A transferência dos explantes que estavam no pulso de auxina foi feita após 24, 48 e 72 horas de pulso. Após a inoculação, todos os explantes foram mantidos na sala de cultura, no escuro, a uma temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A avaliação foi realizada após 56 dias de cultivo. O delineamento foi inteiramente casualizado com oito tratamentos (Tabela 1), sendo 6 repetições (placas) e 5 explantes por repetição. Aos 56 dias avaliou-se: a porcentagem de explantes responsivos para formação de calos (ERFC%) e porcentagem de oxidação (OXI%). O material foi fixado em FAA 70% e após 72 horas conservado em álcool 70% para posterior análise histológica.

**Tabela 1:** Resumo dos tratamentos de pulso auxínico onde o meio contendo reguladores refere-se a presença de 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,68 mM de glutamina enquanto o meio sem reguladores contém apenas, sais, vitaminas e sacarose. Feira de Santana-BA, 2021.

TRATAMENTOS	DESCRIÇÃO
P1	Controle (Contendo reguladores)
P2	Controle (Sem reguladores)
P3	24h de pulso (Sem reguladores)
P4	48h de pulso (Sem reguladores)
P5	72h de pulso (Sem reguladores)
P6	24h de pulso (Contendo reguladores)
P7	48h de pulso (Contendo reguladores)
P8	72h de pulso (Contendo reguladores)

### 3.4 Curva de crescimento de calos

Para a construção da curva de crescimento foi utilizado meio de cultura MS suplementado com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,68 mM de glutamina (melhor tratamento obtido no item 3.3.1) acrescido com 87,64 mM de sacarose e gelificado com 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar, tendo o seu pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . A curva foi determinada pela quantificação da massa fresca (mg) dos explantes com e sem calos, a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) até completar 77 dias, em intervalos de 7 dias, totalizando 12 períodos. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação:  $\text{Pf} - \text{Pi}/\text{Pf} \times 100$ , onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (SMITH, 1992). Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída por cinco unidades experimentais (cinco calos).

### 3.5 Análises do conteúdo de carboidrato

As amostras para a determinação de carboidratos foram retiradas em cada período de incubação (em intervalos de 7 dias), contados a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação). A quantificação bioquímica realizada foi baseada na metodologia descrita por Nogueira et al. (2007) com modificações. Para determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares solúveis totais (AST), foram utilizados 100 mg de explantes frescos e estes foram macerados com auxílio de almofariz e pistilo em 10 mL de água destilada. Em seguida foram colocados em tubo de centrífuga e permaneceram em banho-maria à temperatura de 40°C por 30 minutos e logo após, foram submetidos a centrifugação por 15 minutos a 25°C e 3000 rpm.

O sobrenadante foi recolhido e congelado ( $\pm -6$  °C) para posterior análise. A quantificação dos AST foi realizada pelo método de Antrona (YEMM; WILLIS, 1954) e do AR pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando solução de glicose como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Uv-Vis a 540 nm para AR e 620 nm para AST. O equipamento foi zerado com o branco (0,5 mL de água destilada no lugar da amostra) sendo a quantificação baseada em curva padrão para glicose.

As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicada pelo fator 0,95 (MARTIM, 2003).

### **3.6 Análises histomorfológicas dos calos**

Foram realizadas avaliações histomorfológicas por meio de microscopia óptica nas amostras de calos obtidos a cada períodos da curva de crescimento, assim como nos calos resultantes do experimento com pulso de auxina, visando caracterizar a presença de células em divisão com características embriogênicas e/ou embriões somáticos. Dessa forma, as amostras foram fixadas em FAA 70% durante 72 horas e após a fixação, as amostras foram progressivamente desidratadas em série etanólica (70, 90 e 100%), para cada série foram realizadas duas lavagens, de 1 hora cada.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com historesina e etanol 100% (1:1) durante 12h, e subsequentemente, com historesina pura durante 24h, e em seguida foram emblocadas em historesina (Leica Microsystems®). Secções longitudinais (com aproximadamente 7  $\mu$ m) das amostras embebidas foram obtidas com micrótomo rotatório (Leica RM2235®), utilizando lâmina descartável (Leica 818®). As secções histológicas foram montadas em lâminas e coradas com azul de toluidina (1%) durante 1 minuto. As amostras foram observadas em microscópio óptico Axioplan (Zeiss), e as imagens foram obtidas com câmera Axioncam MRc5 (Zeiss) e processadas com auxílio de Software AxioVision LE Versão 4.8 (Zeiss).

### **3.7 Análise Estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do Software R (v.3.5.3) com auxílio do aplicativo de apoio RStudio. Estes foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de variâncias, sendo Shapiro-Wilk e Bartlett a 5% de probabilidade, respectivamente. Em seguida, foi realizada a análise de variância. No item “3.3.1”, as médias originais foram submetidas a regressão; já no item “3.3.2”, utilizou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- *Efeito da auxina 2,4-D, da citocinina BAP e da Glutamina*

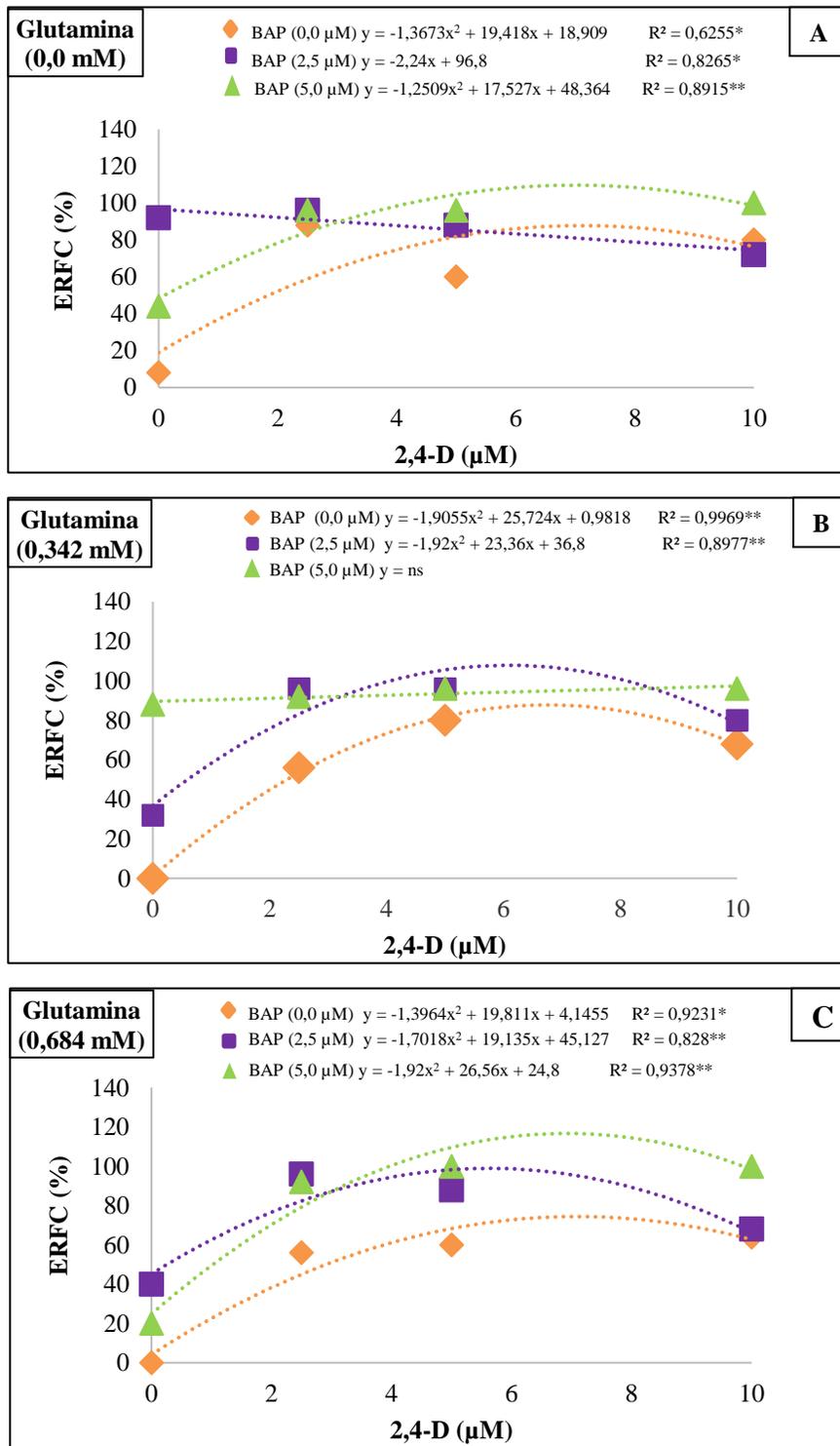
A análise de variância demonstrou efeito altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ) do fatorial triplo “2,4-D x BAP x GLUT” para todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

**Tabela 2:** Resumo da análise de variância para explantes responsivos para a formação de calos (ERFC%), massa fresca dos explantes com calos (MFEC) e área do explante recoberta por calos (ARC%) aos 45 dias, obtidos a partir de explantes foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] submetidas a diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzilaminopurina (BAP) e da Glutamina (GLUT). Feira de Santana-BA, 2021.

FV	GL	Quadrados médios		
		ERFC <sup>x</sup>	MFEC <sup>z</sup>	ARC <sup>x</sup>
<b>2,4-D</b>	3	6,17**	476,02**	3,30**
<b>BAP</b>	2	5,52**	1142,14**	6,48**
<b>GLUT</b>	2	0,53*	60,65**	0,33*
<b>2,4-D x BAP</b>	6	0,37*	9,48 <sup>ns</sup>	0,29**
<b>2,4-D x GLUT</b>	6	0,25 <sup>ns</sup>	34,83*	0,20 <sup>ns</sup>
<b>BAP x GLUT</b>	4	0,12 <sup>ns</sup>	14,49 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>
<b>2,4-D x BAP x GLUT</b>	12	0,51**	51,23**	0,35**
<b>Resíduo</b>	144	0,15	12,19	0,09
<b>CV(%)</b>		38,69	34,36	43,11

\*\* , \* , <sup>ns</sup> Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. <sup>z</sup> Dados transformados pela função  $(x + 1)^{0,5}$ . <sup>x</sup> Dados transformados em arco-seno  $\sqrt{\%}$ .

Ao analisar a porcentagem de explantes responsivos para a formação de calos (ERFC%), verificou-se que na ausência de glutamina foi constatado comportamento quadrático ascendente (Figura 2A) tanto em meio isento ( $p \leq 0,05$ ) de BAP, quanto na maior concentração ( $p \leq 0,01$ ) da mesma. A resolução da equação polinomial indica que o ponto de máxima (87,85%) para “ERFC (%)” na ausência da citocinina, é atingido com a utilização do valor calculado de 7,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Já na maior concentração de BAP testada (5,0  $\mu\text{M}$ ), o ponto de máxima estimado (109,76%) é alcançado com a utilização de 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Figura 2A).



**Figura 2:** Explantes responsivos para formação de calos (ERFC%) obtidos a partir de segmentos foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup>, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021.

Em meio contendo 0,34 mM de glutamina, a variável porcentagem de explantes que formaram calos apresentou comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,01$ ) na ausência e na presença 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, demonstrando pontos de máxima 87,80% e 107,85% nas concentrações estimadas de 6,7 e 6,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, respectivamente (Figura 2B). Na maior concentração de BAP testada (5,0  $\mu\text{M}$ ) não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo.

Na maior concentração de glutamina testada (Figura 2C), a variável “ERFC (%)” apresentou comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,01$ ) para todas as concentrações de BAP testadas, assim, a solução da equação resultou nos seguintes pontos de máxima: 74,41% (0,0  $\mu\text{M}$  de BAP), 95,66% (2,5  $\mu\text{M}$  de BAP) e 116,65% (5,0  $\mu\text{M}$  de BAP), os quais estão associados, respectivamente, as concentrações de 7,1  $\mu\text{M}$ , 5,6  $\mu\text{M}$  e 6,9  $\mu\text{M}$  da auxina 2,4-D.

As plantas possuem um sistema de sinalização que as possibilita perceber e responder aos sinais do ambiente, os quais são mediados por hormônios vegetais como as auxinas e citocininas, possuindo funções essenciais em processos celulares como divisão, expansão e diferenciação, eventos considerados vitais ao crescimento e desenvolvimento (NORDSTRÖM et al. 2004).

Dessa forma, estes hormônios podem ser classificados como compostos químicos endógenos de fácil transporte entre células responsivas, sendo diretamente associados a eventos como o controle da atividade gênica na transcrição e na tradução (GUERRA, TORRES E TEIXEIRA, 1999); assim, é provável que estes grupos de células responsivas sejam caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e então iniciam a resposta na célula, teoria que pode fundamentar a resposta obtida neste estudo quanto a capacidade das células em responder aos estímulos da indução à calogênese.

As auxinas são reguladores responsáveis pelo alongamento celular e por favorecer a calogênese em tecidos vegetais, enquanto as citocininas induzem a expansão celular por meio da multiplicação de células vegetais (ASMAR, 2011). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre formação de raízes. Em condição contraposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são semelhantes, é produzida massa de calo (KRIKORIAN, 1995). A interação entre auxinas e citocininas pode ser sinérgica, antagônica ou aditiva, evidenciando a complexidade presente na troca de sinais do metabolismo vegetal, que também é dependente da espécie e do tecido vegetal em questão (NORDSTRÖM et al. 2004).

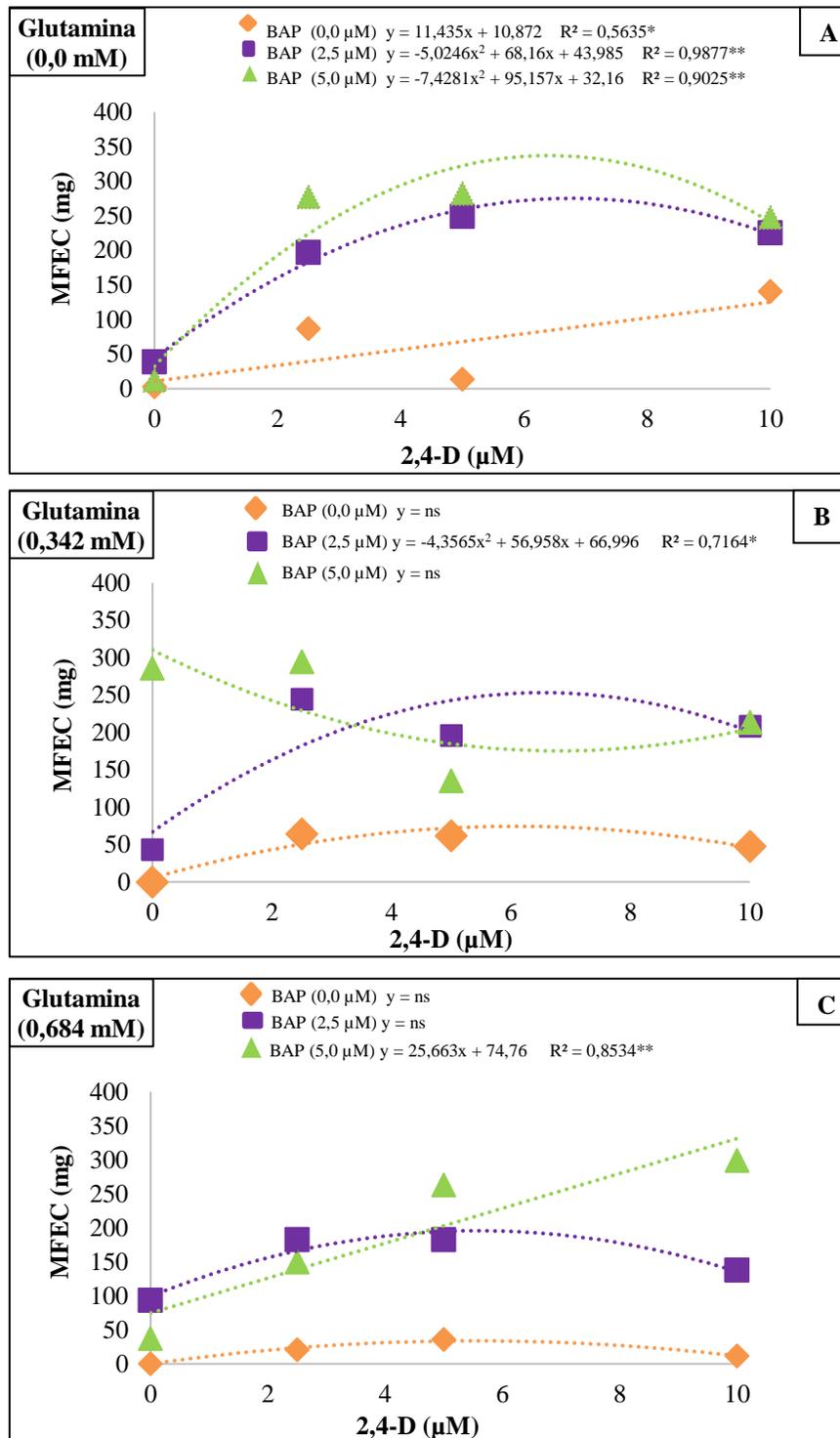
Semelhante ao observado neste trabalho, Reis et al. (2017) combinaram o uso da auxina 2,4-D com a citocinina CIN (cinetina) em explantes foliares e interdonais de *Alternanthera*

*brasiliiana* (L.) Kuntze e perceberam que a taxa máxima (100%) de formação de calos em explantes foliares no período de 30 dias, foi alcançado com a utilização de 4,53  $\mu\text{M}$  de 2,4-D combinado com 4,65  $\mu\text{M}$  de CIN. Já Santos et al. (2016) verificaram a maior porcentagem (100%) de indução de calos em folhas *Piper permucronatum* Yunck. na combinação de 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP. É válido ressaltar que grande parte dos estudos de calogênese são delineados com a utilização da auxina 2,4-D, isso devido a sua característica “potente” na indução de calos (GOMES-COPELAND et al., 2018; KHAN et al., 2018), já que atua no metabolismo do RNA (Ácido ribonucleico), estimulando a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada (GEORGE et al., 2008).

Além da adição da citocinina combinada com a auxina, o uso da glutamina também pode ter influenciado positivamente nos resultados, assim como relatado por Silva et al. (2020) em culturas calogênicas de *Myracrodruon urundeuva*, no entanto, diferente do observado nesse estudo, os autores revelaram a presença de formações globulares, que poderiam ser indícios de potencial embriogênico.

Utilizar a glutamina no meio de cultura, embora seja um tema pouco abordado na literatura, possui relação com a indução de embriões somáticos, como pode ser visto no trabalho de Lino et al. (2008) o qual buscou avaliar o efeito da glutamina na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências masculinas em bananeiras triplóides (*Musa sp*), no qual os autores relataram que, em relação a bananeira ‘Maçã’, houve formação de embriões somáticos de coloração esbranquiçada nas concentrações de 0,342, 0,684 e 1,026 mM de glutamina com frequências de 60%, 50% e 40%, respectivamente. Por outro lado, Lopes et al. (2016), verificaram que a utilização apenas da glutamina não exerceu influência no desenvolvimento dos calos de *Hilocereus undatus*, não apresentando diferenças visíveis nem estatísticas, no entanto esses autores constataram que a suplementação do meio de cultura com 2,4-D e glutamina induziu a formação de calos.

Analisando a variável massa fresca dos calos (MFEC), em meio isento de glutamina, verificou-se comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,01$ ) na presença da citocinina BAP (Figura 3A).



**Figura 3:** Massa fresca dos explantes com calos (MFEFC) obtida a partir de segmentos foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>,<sup>\*\*</sup>,<sup>\*\*\*</sup>, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021.

A resolução da equação polinomial indica que os pontos de máxima estimados de 275,20 mg (2,5  $\mu$ M de BAP) e 336,90 mg (5,0  $\mu$ M de BAP) são atingidos com os valores calculados de 6,78 e 6,40  $\mu$ M de 2,4-D, respectivamente. Na ausência de BAP, a variável apresenta comportamento linear crescente ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 3A). A massa fresca dos calos em meio contendo 0,342 mM de glutamina demonstrou comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,05$ ) na presença de 2,5  $\mu$ M de BAP. Estima-se que o ponto de máxima de 253,17 mg seja obtido com o uso de 6,54  $\mu$ M da auxina 2,4-D (Figura 3B). Para as demais concentrações de BAP testadas, não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo. Analisando a maior concentração (0,68 mM) de glutamina testada em relação às concentrações de citocinina e auxina, observa-se ajuste de um modelo matemático significativo apenas na presença de 5,0  $\mu$ M de BAP, onde a variável demonstra comportamento linear crescente ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 3C).

As divisões celulares necessárias ao crescimento e desenvolvimento dos calos cultivados *in vitro* possuem correlação positiva com a síntese de biomassa. Santos et al. (2014) em culturas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis observaram que o incremento de massa fresca foi dependente da suplementação com auxina (2,4-D) e citocinina (BAP) para indução de calos em explantes foliares, assim como visto neste trabalho, onde o efeito da auxina combinada com a citocinina foi benéfico para o acúmulo de massa fresca nos calos.

Além da utilização de reguladores de crescimento, existem outros fatores que influenciam no processo de calogênese e no desempenho dos calos quanto ao acúmulo de massa fresca, dentre eles o genótipo, tipo de explante e o ambiente de cultivo (FERREIRA; PASQUAL; REZENDE, 2007). Copeland (2015), por exemplo, testando diferentes concentrações de 2,4-D (4,5; 9,0; 13,5; 18,0; 22,5  $\mu$ M) na indução de calos em diferentes acessos de *Poincianella pyramidalis*, verificou que a produção de massa fresca dos calos oriundos de explantes foliares variou entre os acessos utilizados, muito provavelmente pela variabilidade genética que influenciou na diferença entre as taxas de massa fresca, além do efeito da auxina, responsável pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Silva et al. (2020) avaliando o efeito da auxina 2,4-D, da citocinina CIN (cinetina) e da glutamina na calogênese de *Myracrodruon urundeuva* verificaram que ao adicionar 2,5  $\mu$ M de CIN, 2,5  $\mu$ M de 2,4-D associados com 0,68  $\mu$ M de glutamina no meio de cultura, foi alcançada a maior média (166,73 mg) de massa fresca a partir de explantes foliares da espécie enquanto que o aumento das concentrações (5,0  $\mu$ M de CIN, 5,0  $\mu$ M de 2,4-D e 1,37  $\mu$ M de Glutamina) no meio

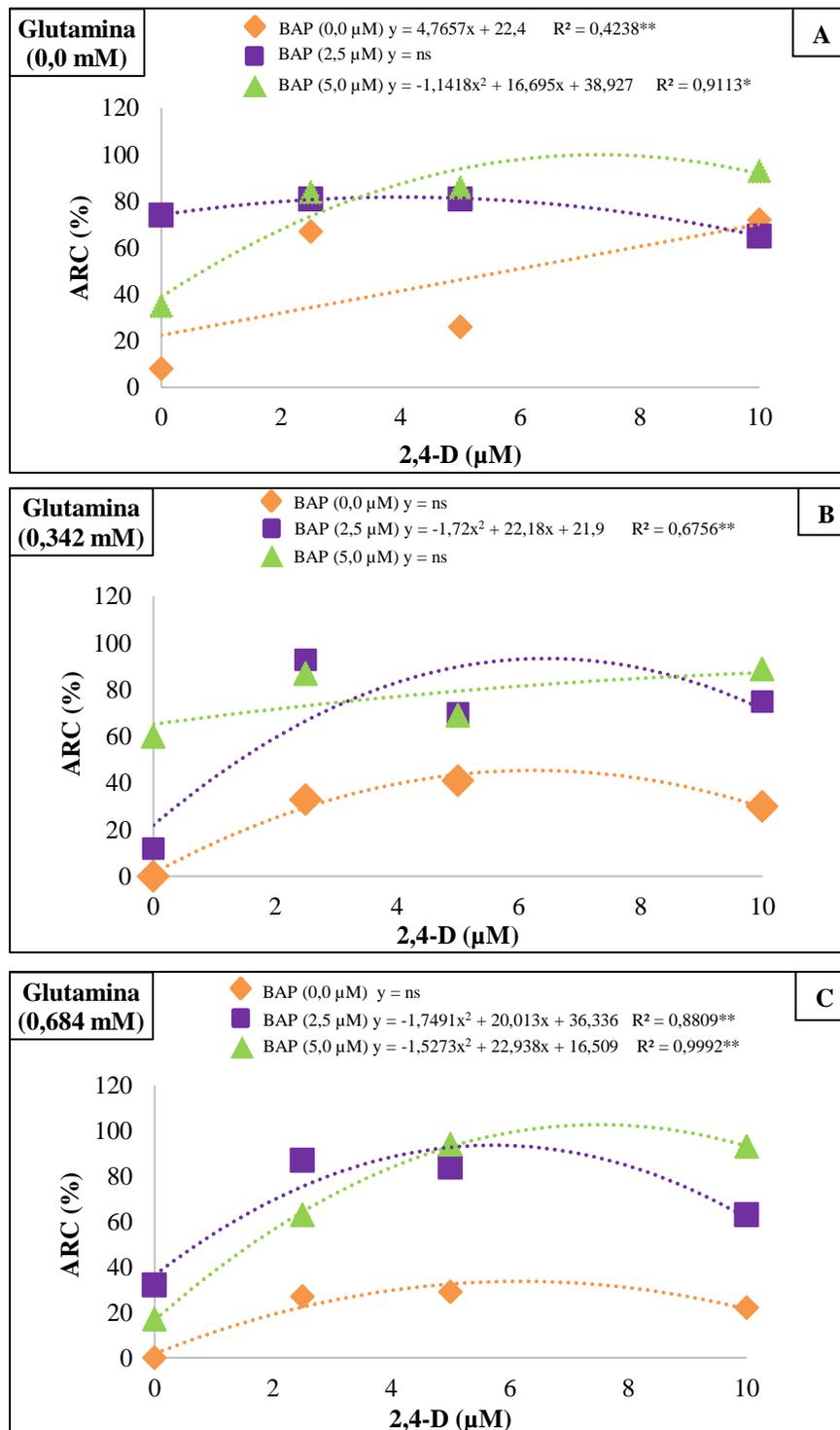
de cultura foi suficiente para redução do conteúdo de massa fresca, resultando em 144,15 mg de biomassa. Estes resultados evidenciam a presença de um ponto crítico, ou seja, até determinada concentração existe uma máxima no ganho de massa fresca. Todavia, neste estudo com a catingueira, a presença de 0,684 mM de glutamina em combinação com auxina 2,4-D e 5,0  $\mu$ M de BAP, resultou em comportamento linear crescente, sugerindo que o ganho de massa fresca em meio contendo os reguladores e a glutamina tende a aumentar à medida que as concentrações também são elevadas.

Para a porcentagem da área do explante recoberto por calos (ARC%) foi constatado comportamento quadrático ascendente em meio isento de glutamina quando utilizada a maior concentração de BAP (5,0  $\mu$ M) ( $p \leq 0,05$ ) resultando em um ponto de máxima estimado de 99,95% com o uso de 7,3  $\mu$ M de 2,4-D (Figura 4A).

Na presença da glutamina (Figura 4B), a variável apresentou comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,01$ ) em meio contendo 2,5  $\mu$ M de BAP com máxima de 93,40% obtida no valor calculado de 6,4  $\mu$ M da auxina 2,4-D. O uso de 0,68 mM de glutamina, na presença de BAP, demonstrou comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,01$ ) para a variável em estudo, sendo que a resolução da equação polinomial resultou em máximas de 93,58% (2,5  $\mu$ M de BAP) e 102,63% (5,0  $\mu$ M de BAP) obtidos em meio contendo 5,7 e 7,5  $\mu$ M da auxina, respectivamente (Figura 4C).

Analisando os resultados verifica-se que o aumento nas concentrações de 2,4-D testadas até certo ponto, bem como a elevação nas concentrações de BAP, favorecem o aumento da calosidade na área foliar, possibilitando concluir que, para a *C. pyramidale*, foi preponderante a presença de ambas as classes de fitorreguladores na indução da calogênese e, conseqüentemente, extensão de tecido contendo calo ao longo do explante (Figura 4).

Dessa maneira, é importante destacar que quando os explantes apresentam zonas de tecidos meristemáticos, apresentam também uma maior formação de células de calo, isso porque as regiões meristemáticas sintetizam quantidades de auxinas, que combinadas a citocinina do meio de cultura promovem uma maior proliferação celular, fato este que pode explicar o ocorrido neste estudo. Alguns tecidos como a folha, por exemplo, evidenciam uma maior dependência de reguladores de crescimento no meio de cultura, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam (CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA, 1998).



**Figura 4:** Área do explante recoberta por calos (ARC%) obtida a partir de segmentos foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina (<sup>ns</sup>,<sup>\*\*</sup>,<sup>\*</sup>, não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana - BA, 2021.

Os resultados encontrados foram opostos aos obtidos por Rocha (2014) em estudos de indução de calos em *Cissus verticillata*, nos quais verificou-se que as maiores porcentagens da área do explante recoberta por calo foram obtidos na presença de 4,44 e 17,76  $\mu\text{M}$  de BAP na ausência do 2,4-D, onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da área foliar coberta por calos. Por outro lado, Nogueira et al. (2007) relataram a maior porcentagem de área do explante coberta por calos (99,18%) em *Byrsonimia intermedia* A. Juss, com a utilização 10,87  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Em *Capsicum. chinense* Jacq., o meio suplementado com 9,05  $\mu\text{M}$  de 2,4-D induziu 100% da área do explante recoberta por calo em segmentos nodais e internodais. Entretanto, para explantes foliares a combinação mais eficiente ocorreu entre 4,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 11,11  $\mu\text{M}$  de BAP, alcançando um percentual de 77% de área contendo calos (SMOZINSKI; SANTOS, 2019).

Em relação a coloração dos calos, as cores variam desde tons mais claros até mais escuros com aspecto de oxidado (Figura 5). De modo geral, mais de uma cor acaba representando o tratamento em si, afinal, calos são células que em razão da variabilidade genética se desenvolvem apresentando características variadas como é o caso da coloração.



**Figura 5:** Diversidade de cores relacionadas aos tratamentos de indução à embriogênese somática em calos de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias de cultivo em meio MS, acrescido de diferentes concentrações da citocinina BAP, da auxina 2,4-D e da Glutamina. Feira de Santana - BA, 2021.

No que se refere a textura, verificou-se calos friáveis, compactos e calos com partes friáveis e compactas simultaneamente (Tabela 2). No geral, os calos de catingueira apresentam, em sua maioria, regiões compactas e friáveis no mesmo calo, dificilmente mantendo um padrão dominante de apenas característica friável ou compacta em um quantitativo que seja significativo.

Quando relacionada a textura com a coloração, observou-se que as maiores taxas de calos compactos foram obtidas na coloração 157B, 155C E 152B, já o maior percentual de calos friáveis está associado, de forma geral, as cores 152B e 157B (Tabela 2).

A obtenção de calos friáveis é importante na propagação *in vitro* quando se objetiva o cultivo de células em suspensão, pois são mais facilmente separáveis (COSTA et al., 2008); além disso, segundo Vasconcelos et al. (2012), calos friáveis são mais promissores à embriogênese somática por conter células arredondadas e com características meristemáticas.

Já os calos compactos que são mais coesos e possuem células vacuoladas com parede celular mais espessa, tendem a expressar maior potencial organogênico. Quanto à fonte do explante, haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogênica. Na composição mineral do meio de cultura, os reguladores de crescimento serão os fatores decisivos (BARRUETO, 2014).

**Tabela 3:** Coloração dos calos, porcentagem de calos friáveis (%CF), calos compactos (%CC) e calos com partes friáveis e compactas (%CFC) obtidos a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] aos 45 dias inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações da citocinina BAP, da auxina 2,4-D e da Glutamina.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Coloração	%CF	%CC	%CFC
<b>Glutamina 0,0 mM</b>					
<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	N199A	-	8	-
	<b>2,5</b>	155C	0	76	8
	<b>5,0</b>	155C/157B	4	44	12
	<b>10,0</b>	202A/152B	20	12	48
<b>2,5</b>	<b>0,0</b>	200C	20	56	16
	<b>2,5</b>	152B	8	12	76
	<b>5,0</b>	152B/157B	56	-	32
	<b>10,0</b>	N155A	12	-	60
<b>5,0</b>	<b>0,0</b>	200C	-	36	8
	<b>2,5</b>	152B	-	40	56
	<b>5,0</b>	152D/152B	0	48	48
	<b>10,0</b>	152B/N199A	40	8	52
<b>Glutamina 0,342 mM</b>					
<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	-	-	-	-
	<b>2,5</b>	155C	-	28	28
	<b>5,0</b>	157B	4	40	36
	<b>10,0</b>	157B/152B	-	56	12

2,5	0,0	157B	-	20	12
	2,5	152B	12	-	84
	5,0	152B	-	48	48
	10,0	152D	16	36	28
5,0	0,0	155C	-	64	24
	2,5	N199A	24	-	68
	5,0	200C/N199A	4	52	40
	10,0	N200C	28	32	36
<b>Glutamina 0,684 mM</b>					
0,0	0,0	-	-	-	-
	2,5	155C	-	56	-
	5,0	152D/157B	28	12	20
	10,0	202C	16	20	12
2,5	0,0	157B	-	32	8
	2,5	157B	-	24	72
	5,0	152D/157B	-	28	60
	10,0	157B	4	16	48
5,0	0,0	152D	-	8	12
	2,5	152D/N199A	8	36	48
	5,0	152D	-	24	76
	10,0	157B	16	24	60

Diferentemente do resultado relatado acima, os estudos de calogênese em *Segurella* (*Satureja hortensis* L.) realizados por Navroski et al. (2012) relataram que a maior formação de calos friáveis se deu com a adição da auxina ANA na ausência da citoninina BAP. Por outro lado, Santos et al. (2005), avaliando a indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd) constataram que o aumento da concentração da auxina 2,4-D promoveu um aumento crescente na porcentagem de explantes que formaram calos friáveis, obtendo uma porcentagem de aproximadamente 90% de explantes com estes calos. Costa et al. (2008) em estudos sobre a influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC verificaram que o maior percentual de calos friáveis formados em *Piper hispidinervum* é obtido em explantes foliares cultivados em meio acrescido da auxina ANA e 2,4-D em altas concentrações (59 e 101,80  $\mu$ M), causou fitotoxicidade aos explante.

Semelhante ao verificado neste trabalho com a *C. pyramidale*, Silva (2017) trabalhando com calogênese em aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) verificou que os calos se apresentaram com cores que variaram entre marrom, verde e escuro (tons de cinza e preto, oxidados) na maioria dos tratamentos, e em relação à textura, a autora revelou a presença de calos friáveis, compactos e ainda calos com parte friáveis e compactas. Entretanto, diferente do observado para catingueira, boa parte dos tratamentos apresentou textura friável. Já Menezes et al. (2012), observaram formação de calos em *Saccharum* spp. com textura friável e coloração amarela.

- *Indução de calos via pulso auxínico com 2,4-D*

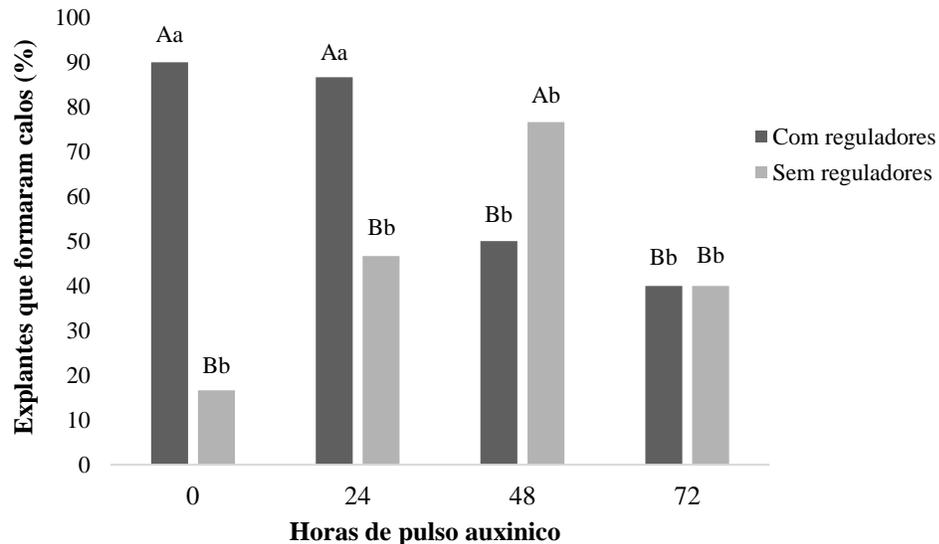
A análise de variância do experimento de indução de calos via pulso auxínico revelou efeito altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ) da interação “Pulso x Reguladores” para a variável explantes responsivos para formação de calos (ERFC%) e significativo ( $p \leq 0,05$ ) para a variável oxidação (OXI) (Tabela 3).

**Tabela 4:** Resumo da análise de variância para explantes responsivos para a formação de calos (ERFC%) e oxidação (OXI%), aos 56 dias de incubação, relacionados ao pulso de 2,4-D durante 0, 24, 48 e 72 horas na presença e/ou ausência de 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina, em explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.]. Feira de Santana-BA, 2021.

FV	GL	Quadrados médios	
		ERFC	OXI
<b>PULSO</b>	3	0,35 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>
<b>REGULADORES</b>	1	1,50*	0,25 <sup>ns</sup>
<b>PULSO X REGULADORES</b>	3	1,55**	0,72*
<b>Resíduo</b>	40	0,24	0,23
<b>CV(%)</b>		65,61	85,58

\*\* , \* , ns Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. Dados transformados em arco-seno  $\sqrt{\%}$ .

Ao analisar a variável porcentagem de explantes que formaram calos, foi verificado que entre as maiores médias, houve diferença estatística quando analisado apenas a presença e/ou ausência dos reguladores de crescimento testados em relação aos tempos de exposição em pulso de auxina (Figura 6).



**Figura 6:** Explantes que formaram calos (%) de acordo aos respectivos períodos (0, 24, 48 e 72 horas) de pulso auxínico em segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] utilizando meio de cultura MS na presença e/ou ausência da combinação 5,0  $\mu$ M de BAP, 7,0  $\mu$ M de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina após 56 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula comparam as horas de pulso auxínico e maiúscula quanto a presença ou ausência de reguladores em relação ao período de pulso, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Feira de Santana - BA, 2021.

Entretanto, o estudo revelou comportamento crescente quanto ao percentual de formação de calos até 48 horas de pulso auxínico na ausência dos reguladores de crescimento (Figura 5), resultado este que pode viabilizar o uso do pulso auxínico para indução de calos em *C. pyramidale* e que, por outro lado, evidencia o efeito negativo da combinação do pulso de auxina com os reguladores de crescimento diluídos no meio de cultura, já que após 24h de pulso auxínico, em meio contendo reguladores de crescimento, a taxa de indução de calos diminuiu, bem como caiu drasticamente após 48h de pulso auxínico em meio isento de reguladores, indicando possíveis efeitos negativos da exposição do material vegetal a níveis elevados de fitoreguladores.

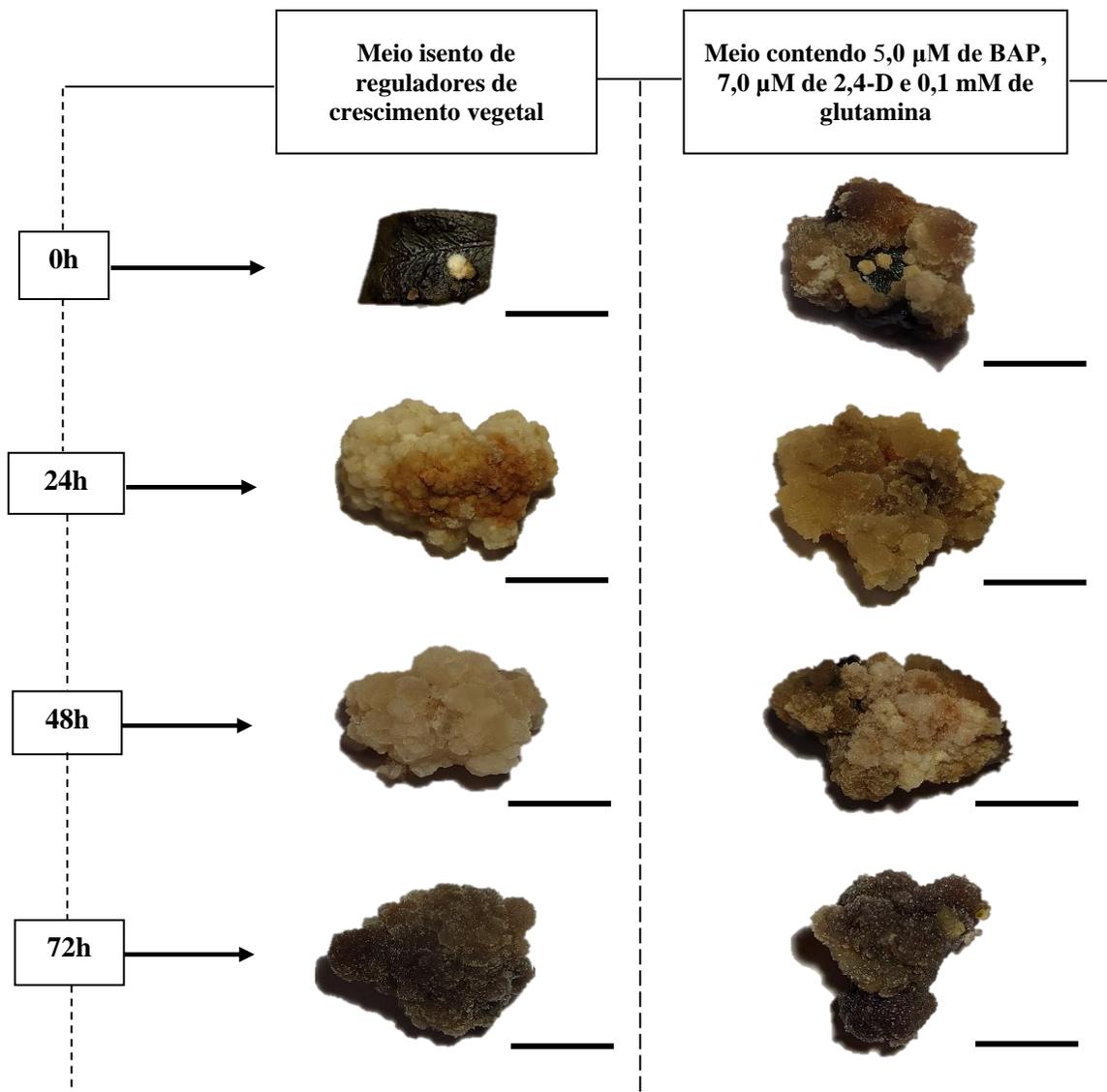
Tratamentos com pulso de auxina, embora ainda pouco utilizados na indução de calos, está intimamente relacionado com o estímulo necessário às células dos tecidos vegetais para aquisição de competência embriogênica, como visto neste estudo. Alguns autores que também utilizaram o pulso de auxina na morfogênese, relatam que a utilização deste tipo de tratamento pode ser feita

em algumas horas ou até dias, a depender do objetivo (SHARMA et al., 2007; ZAYTSEVA; POLUBOYAROVA; NOVIKOVA, 2016).

Em alguns casos, utilizar este método tem como objetivo minimizar os efeitos negativos relacionados a morfologia das plantas propagadas *in vitro*, visto o longo tempo de exposição aos fitormônios, que resulta, muitas vezes, em problemas como hiperidricidade e fasciação (FAISAL, 2012). Para o estudo desenvolvido por Moura et al. (2019), o tratamento com pulso de auxina foi testado como um gatilho para a célula, uma forma de estresse visando embriogênese somática, já que o pulso endógeno da auxina pode ser um dos sinais primários para a indução de embriogênese somática, e, dessa maneira, exposição exógena a níveis elevados de auxina também podem trazer resultados satisfatórios. Ainda neste estudo citado, os autores relataram que o tratamento de pulso auxínico utilizando picloram (207,02  $\mu\text{M}$ ) pode ser utilizado como fonte inicial de estresse para a aquisição de competência embriogênica em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* onde as melhores médias para indução do calo embriogênico foram obtidas com até 48h de pulso.

Outros estudos utilizando auxina na indução de calos com potencial embriogênico, sugerem que o estresse estimulado pelo fornecimento de altas doses de auxina exógena tem influência positiva, ativando mecanismos para expressão genética das células, no entanto, após a indução, o desenvolvimento posterior dos embriões depende da retirada do material da exposição por auxinas ou redução da concentração, isto porque as células embrionárias em desenvolvimento também produzem alguns mRNAs e proteínas que inibem o desenvolvimento futuro da embriogênese em meios suplementados de auxina (KRISHNAN; SIRIL, 2017; YANG E ZHANG, 2010). Sharma et al. (2007) utilizando o pulso de auxina na embriogênese somática de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desiree afirmaram que apesar do tratamento pulso não ter reduzido o período necessário para o processo de embriogênese somática na batata, no que tange a aplicabilidade do método visando operações comerciais, a abordagem apresentada oferece potencial, considerando que a embriogênese somática é uma ferramenta eficaz na multiplicação massal de genótipos de elite.

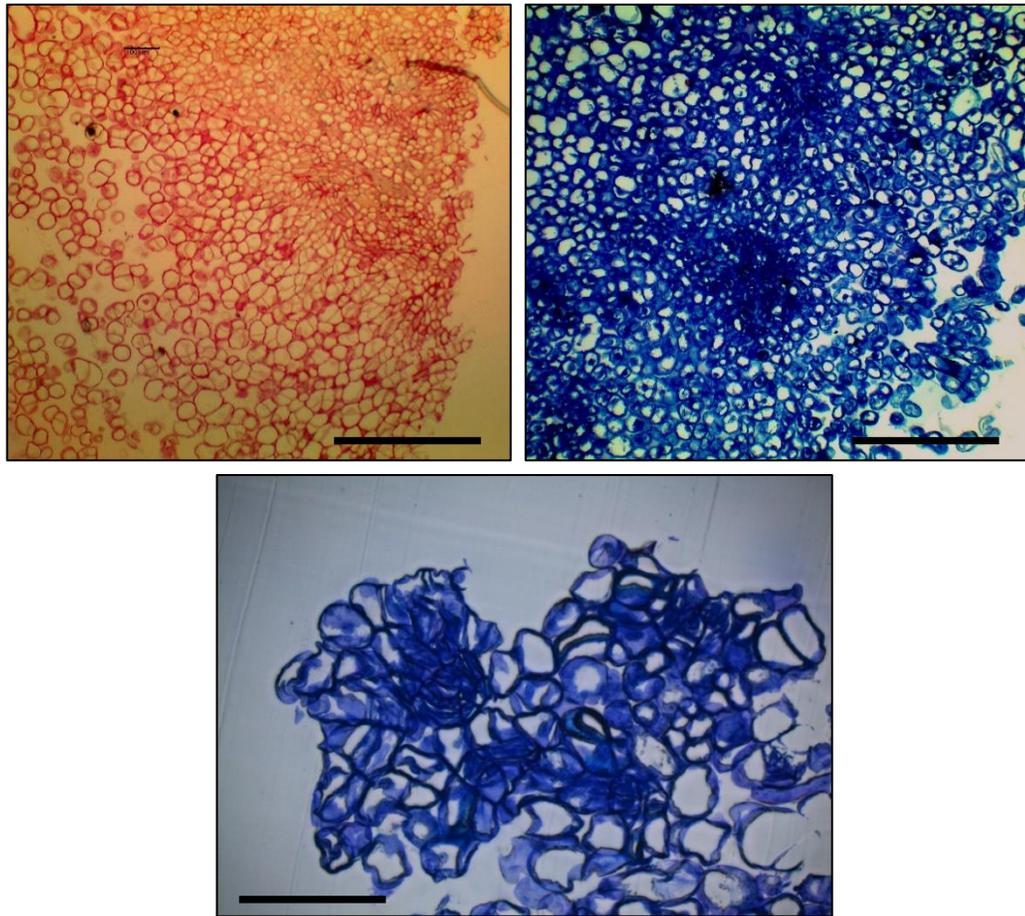
A morfologia dos calos submetidos ao tratamento pulso, em geral, não difere dos calos obtidos com uso contínuo dos reguladores de crescimento vegetal (Figura 7).



**Figura 7:** Aspectos morfológicos dos calos submetidos aos diferentes tratamentos de pulso auxínico (0, 24, 48 e 72h) em meio isento de reguladores e meio contendo a combinação de reguladores resultante do melhor tratamento obtido no experimento anterior utilizando explantes foliares de *C. pyramidale* aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 25 μM. Feira de Santana - BA, 2021.

Os calos oriundos de tratamentos com pulso de auxina conservam características estruturais (presença de regiões friáveis e compactas no mesmo calo) e mantém o padrão de coloração obtido nos tratamentos de calogênese com uso contínuo dos reguladores de crescimento, exceto nos tratamentos de 24 e 48h de pulso auxínico em meio isento de reguladores, onde os calos, em sua maioria compactos, apresentavam coloração clara e regiões com formações globulares evidentes. Todavia, ao submetê-los a análise morfohistológica, não foi possível identificar a presença de

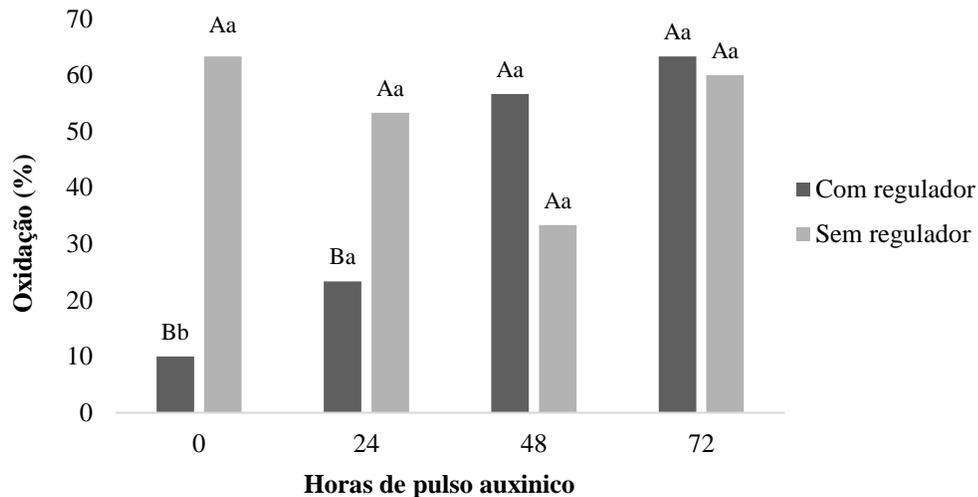
células com característica meristemática; no geral, verificou-se células desorganizadas, vacuoladas e sem núcleo aparente (Figura 8).



**Figura 8:** Aspectos histológicos de amostras de calos submetidos aos diferentes tratamentos de pulso auxínico partindo de explantes foliolares de *C. pyramidale* aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 100  $\mu$ M. Feira de Santana - BA, 2021.

A relação entre o percentual de formação de calos e ocorrência de oxidação no calo é inversamente proporcional, ou seja, as maiores taxas de oxidação ocorrem justamente naqueles tratamentos onde a porcentagem de explantes responsivos para formação de calos foi menor. Embora não haja diferença estatística entre os tratamentos de pulso auxínico na ausência dos reguladores de crescimento vegetal, o tratamento controle (sem o estímulo do pulso auxínico) apresentou elevada taxa de oxidação, evidenciando a importância dos reguladores de crescimento vegetal na indução dos calos. Em meio contendo a combinação de reguladores de crescimento vegetal e glutamina, verificou-se comportamento crescente do percentual de oxidação à medida

que aumentou o tempo de exposição ao pulso auxínico, sendo que neste caso, 48 e 72h registram as maiores taxas de oxidação e diferem estatisticamente do 0 e 24h de pulso auxínico (Figura 9).



**Figura 9:** Oxidação (%) em calos de acordo aos respectivos períodos (0, 24, 48 e 72 horas) de pulso auxínico em segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] utilizando meio de cultura MS na presença e/ou ausência da combinação 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,68 mM de glutamina após 56 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula comparam as horas de pulso auxínico e maiúscula quanto a presença ou ausência de reguladores em relação ao período de pulso, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Feira de Santana - BA, 2021.

Em espécies lenhosas é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese desses compostos (BASSAN et al., 2006). Além disso, a oxidação fenólica tende a dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (BASSAN et al., 2006).

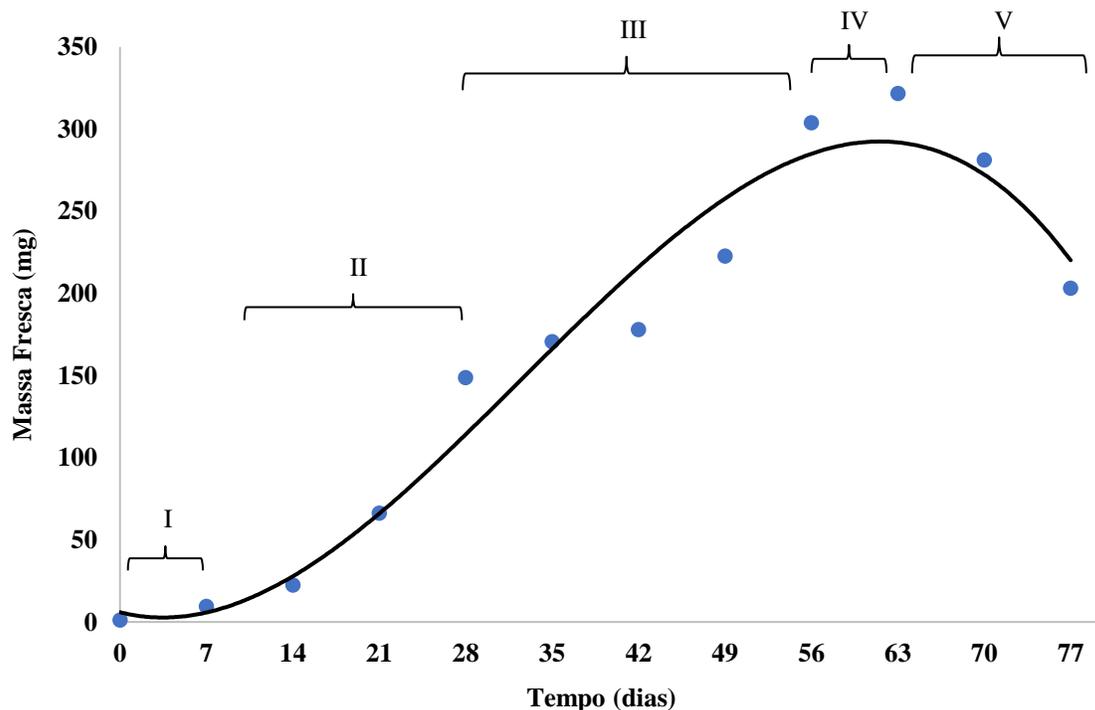
O uso do 2,4-D, considerada uma auxina potente, pode afetar a oxidação diretamente, como nos resultados obtidos por Silva et al. (2009), nos quais foram verificados que quanto maior o tempo de exposição à auxina, maiores foram as taxas de oxidação na tentativa de induzir calos em *Coffea arabica* L. Por outro lado, a oxidação de explantes cotiledonares em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* em estudos de indução a embriogênese somática foi considerada pelos autores como um sinal de formação de calos embriogênicos, uma vez que a porcentagem destes calos aumentou

proporcionalmente a ocorrência de oxidação (MOURA et al., 2019). É importante estudar o efeito da oxidação fenólica, principalmente em espécies lenhosas, visto que este processo metabólico tende a ser negativo quando causa a morte do explante ou do calo, mas pode ser benéfico como no estudo citado anteriormente.

- *Curva de crescimento e histologia de calos*

Analisando a curva de crescimento dos calos, verificou-se padrão sigmoidal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio (Figura 10).

Neste estudo, a primeira fase, conhecida como fase lag, ocorreu até o 7º dia (Figura 10) e representou um percentual de 88,99% de crescimento, que pode ser considerado elevado quando comparado ao estudo de calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. onde os autores verificaram, neste mesmo intervalo de tempo, crescimento de 33,86% (SILVA et al., 2020).



**Figura 10:** Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] inoculados em meio de cultura MS suplementado com 5,0  $\mu$ M de BAP, 7,0  $\mu$ M de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina durante 77 dias de incubação exibindo distintas fases: I – lag; II – exponencial; III – linear; IV – desaceleração e V – declínio. Feira de Santana - BA, 2021.

Esta fase pode ser definida como o período em que as células do tecido vegetal iniciam a produção de energia e preparam-se para o início das divisões celulares, o que, segundo Stein et al. (2010), acontece em virtude do início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas. Em outros estudos é possível perceber as diferenças entre as espécies quanto ao tempo em que a mesma fase ocorre, como no trabalho de Santos, Souza e Paz (2017) que verificaram que a fase lag na curva de crescimento dos calos obtidos a partir de folhas de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño ocorreu desde o dia da inoculação até o 12º dia de cultivo. Por outro lado, Stein et al. (2010) verificaram que essa mesma fase em culturas de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. ocorreu até o 40º dia.

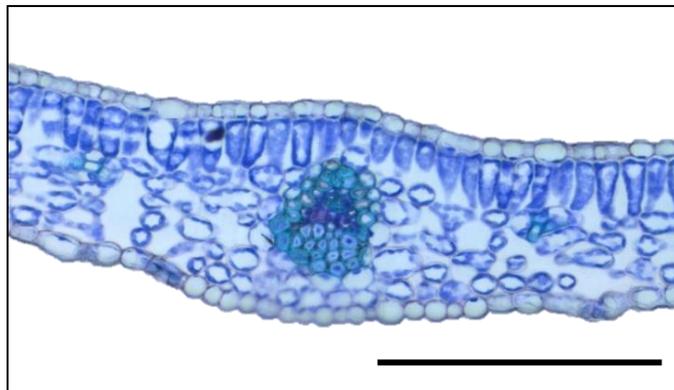
A fase dois, também chamada de exponencial, ocorreu entre o 7º e o 28º dia de cultivo, cuja taxa de crescimento foi de 93,62% (Figura 10). Neste intervalo verificou-se leve aumento na taxa de crescimento quando comparado a fase anterior. O início desta fase é marcado pelo aumento das divisões celulares, comportamento que, diferentemente da *C. pyramidale*, em explantes foliares de *Piper permucronatum* se expressou do 21º ao 49º dia de cultivo (SANTOS et al., 2016). Entretanto, em calos de aroeira-do-sertão, partindo de explantes foliares, a fase exponencial ocorre exatamente do 7º ao 28º período de cultivo, comportamento similar ao da espécie em estudo (SILVA et al., 2020).

A fase linear foi observada entre o 28º e o 56º dia após inoculação, representando um percentual de crescimento de 51,07% (Figura 10). Nesse período os calos tendem a diminuir o processo de divisão celular e aumentar a área celular (FEITOSA et al., 2013). Para *Hilocereus undatus* esse momento foi observado entre 14 e 28 dias (LOPES et al., 2016); já em *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño o crescimento dos calos oriundos de folhas apresentou fase linear do 25º ao 31º dia de cultivo (SANTOS, SOUZA; PAZ, 2017). Resultados esses que diferem dos encontrados por Abbade et al. (2010) em estudos com o ipê-branco, onde se observou o período de crescimento linear entre os 45º e 60º dias pós inoculação.

A interpretação da curva de crescimento dos calos de catingueira revelou que do 56º ao 63º dia de cultivo iniciou-se a fase de desaceleração (Figura 10) com taxa de crescimento que chegou a 5,57%, período extremamente relevante ao estudo, que se caracteriza pela redução das divisões celulares, maior produção de metabólitos secundários e, principalmente, marca o momento que deve ser iniciado o processo de repicagem dos calos (PAN et al., 2020). De acordo com Santos et al. (2016) o início do processo de repicagem deve ocorrer na fase de desaceleração devido à redução

de nutrientes, produção de compostos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Por fim, a quinta e última fase identificada no presente estudo foi a fase de declínio, representada do 63° ao 77° dia de cultivo (Figura 10), com percentual de crescimento de -58,44%, valor este que está intimamente ligado a definição desta fase, que segundo Santos et al. (2010) é o período em que ocorre perda de peso devido a morte celular. Diferente deste estudo, na cultivar *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo, a fase de declínio compreendeu do 34° ao 42° dia, no qual não havia mais produção de calos (SOUZA, 2016).

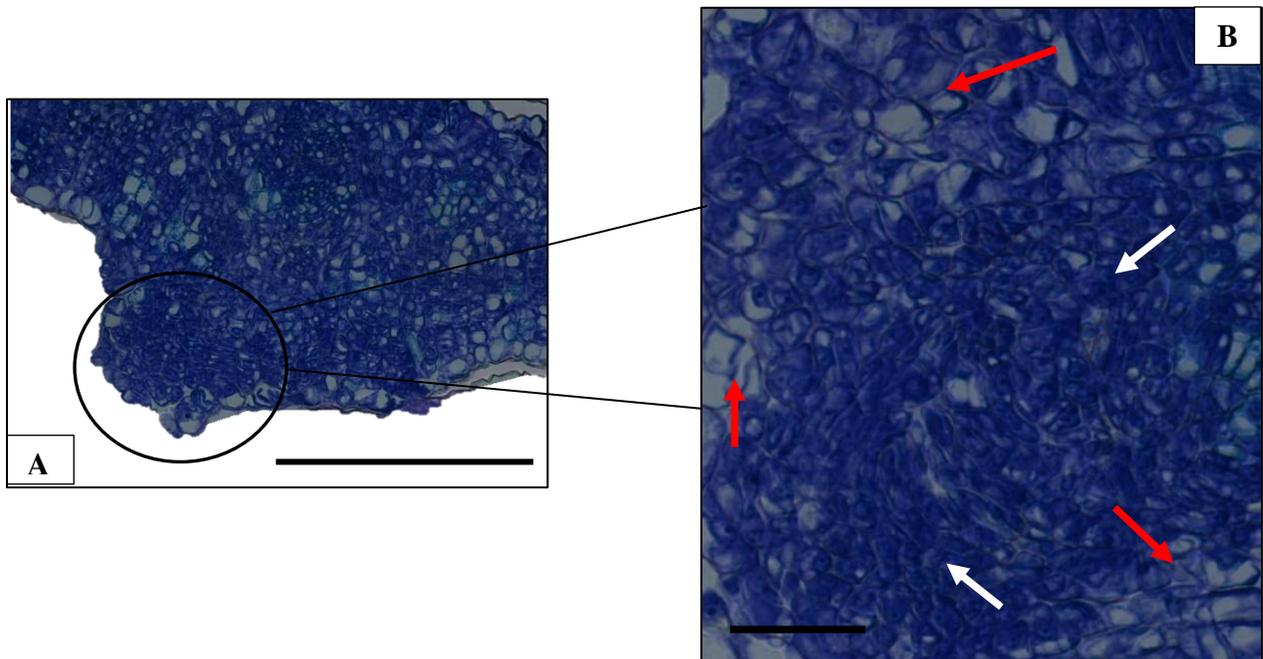
Amostras de diferentes períodos da curva de crescimento foram submetidas a avaliações histomorfológicas, visando identificar possível potencial embriogênico. Inicialmente, a seção transversal do explante foliar antes da inoculação, revela, em seu estado de origem, estruturas como epiderme unisseriada em ambas as faces, sendo hipoestomática, parênquima paliçádico também unisseriado, parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, característico de folhas provenientes do cultivo *in vitro*, ainda sem nenhum tipo de alteração anatômica (Figura 11).



**Figura 11:** Detalhes anatômicos do corte transversal do explante foliar de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] antes da inoculação. Barra = 100  $\mu$ M. Feira de Santana - BA, 2021.

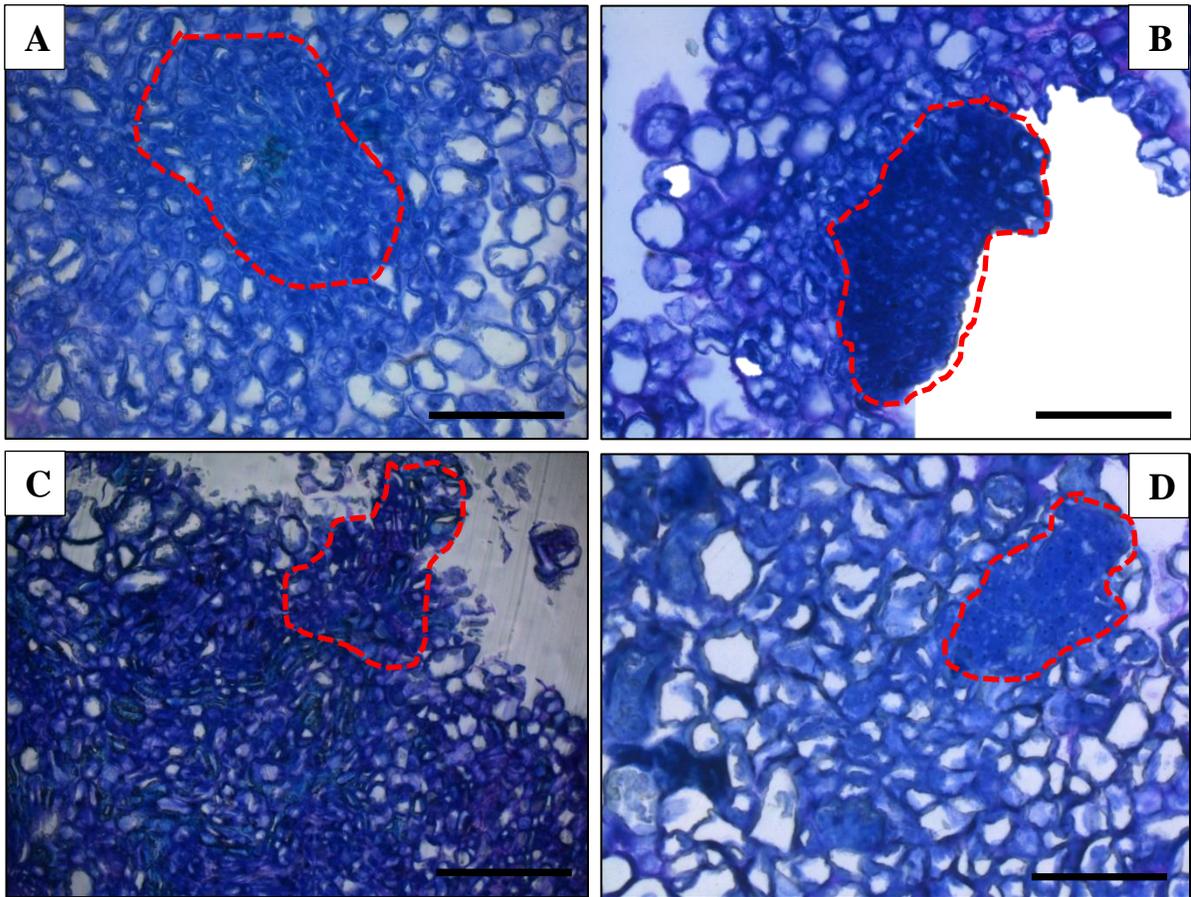
Após 7 dias de incubação, período que corresponde ao fim da fase lag e início da fase exponencial da curva de crescimento, foi possível observar uma grande evolução anatômica com modificação estrutural visualizada através do aumento do número de células a partir do parênquima lacunoso, com a presença de grupos de células aderidas e pouco organizadas (Figura 12A). Na figura 12B pode-se verificar a formação de calo com a presença de células com baixo potencial meristemático, por apresentarem-se altamente vacuoladas (setas vermelhas), e a existência de

células pequenas, isodiamétricas, pouco vacuolizadas (setas brancas). No entanto, esses calos ainda não apresentavam características embriogênicas, ou seja, não possuíam células isodiamétricas, com núcleo evidente e citoplasma denso, o que caracteriza células meristemáticas, e que podem indicar que aos 7 dias, o calo induzido possui características de culturas embriogênicas.



**Figura 12:** Aspectos histológicos, em corte transversal, dos calos ao 7º dia de crescimento, oriundos de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina. A = objetiva de 20x; B= objetiva de 40x. Barra = 100 µM Feira de Santana - BA, 2021.

Ao decorrer do desenvolvimento dos calos, mais especificamente durante a fase exponencial e até o fim da fase linear (do 21º ao 42º dia de incubação), verificou-se a que os calos apresentam células com características meristemáticas, i.e., isodiamétricas, aderidas, pouco vacuolizadas, com citoplasma denso e núcleos proeminentes, em meio a grupos de células altamente vacuolizadas (não meristemática). Estas características sugerem que as células do calo estão em divisão celular e, neste caso, podem evoluir com a formação de áreas meristemáticas periféricas (SILVEIRA et al., 2013) (Figura 13). Este tipo de célula, a depender do estímulo, pode se tornar competente para se dividir e diferenciar em embriões somáticos.



**Figura 13:** Aspectos histológicos dos calos, evidenciando (em vermelho) a presença de células com características meristemáticas ao 21° (A), 28° (B), 35° (C) e 42° (D) dia de incubação, oriundos de explantes foliares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] em meio de cultura MS suplementado com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina. Barra = 100  $\mu\text{m}$  Feira de Santana - BA, 2021.

A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfogenético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico (GUERRA; NODARI, 2006); a qual pode ser influenciada por diversos fatores, entre os quais podem se destacar os diferentes genótipos e tipos de explante, estádios de desenvolvimento dos explantes, composição do meio de cultura, tipo e concentração do regulador de crescimento utilizado (CARNEROS et al., 2009).

A embriogênese somática indireta requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas, eventos que dependem da ação de reguladores de crescimento, não apenas para a retomada da atividade mitótica, mas também para a

determinação do estágio embriogênico (MACIEL et al., 2003). As auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. Neste estudo, os resultados supracitados quanto à identificação das principais alterações morfoanatômicas presentes nas células ao longo do desenvolvimento dos calos, evidenciam efeito positivo da suplementação com reguladores de crescimento vegetal, assim como em estudos com Sisal (*Agave sisalana* Perrine), onde Carneiro et al. (2014) relataram que o uso do 2,4-D e BAP foi preponderante na indução de calos com potencial embriogênico.

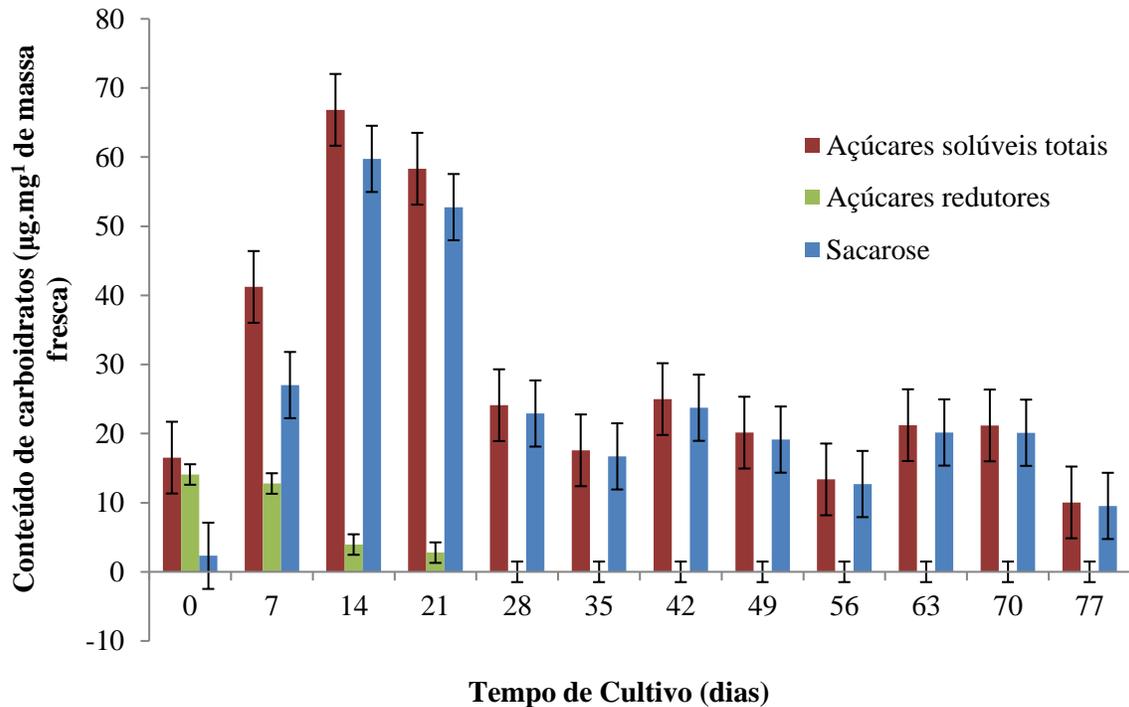
Silveira et al. (2013) descrevem em estudos com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) que, para determinação de características que diferem os calos embriogênicos dos não-embriogênicos, o calo embriogênico, a partir de confirmações histológicas, tende a apresentar células pequenas, isodiamétricas, ricas em citoplasma e formando estruturas globulares, enquanto os calos não embriogênicos, possuem células bastante desorganizadas, alongadas e altamente vacuoladas. Assim, neste estudo com a catingueira, foi possível identificar evidências morfohistológicas intimamente ligadas as características supracitadas para os calos embriogênicos, assim como observou-se células de calos sem nenhum potencial para desenvolvimento de embriões somáticos.

- *Análise do conteúdo de carboidratos*

A análise bioquímica dos calos após 77 dias de cultivo revelou a presença de açúcares solúveis totais (AST), sacarose e açúcares redutores (AR), sendo que, este último, após o 21º dia pós inoculação não foi detectado pelo método utilizado, provavelmente porque o que era produzido estava sendo prontamente consumido em função das demandas celulares. Os teores de açúcares solúveis totais e sacarose aumentaram até o 14º dia de cultivo, com queda a partir do 21º dia (Figura 14). Verificou-se que, do dia “zero” (explantos antes da inoculação) até o 21º dia de cultivo, os teores de AR sofreram uma redução enquanto o contrário ocorreu com os AST e sacarose, período que corresponde a fase lag e início da fase exponencial da curva de crescimento dos calos (Figura 14).

O início da fase exponencial é, por consequência, período de alta demanda energética, que foi marcado neste estudo, inicialmente pela redução do conteúdo de AR e após o 21º dia, diminuição significativa dos teores de AST e sacarose. Esse resultado é semelhante ao relatado por Santos et al. (2008) que ao analisarem o conteúdo de açúcares redutores de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' verificaram que o teor máximo de

açúcares redutores ocorreu no dia da inoculação dos explantes (0 dia de cultivo, início da fase lag), a partir do qual sofreu redução, atingindo um teor mínimo no 84º dia, que foi o último de cultivo.



**Figura 14:** Conteúdo de carboidratos dos calos de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] formados a partir de explantes foliolares inoculados em meio de cultura MS suplementado com 5,0 µM de BAP, 7,0 µM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina, durante 77 dias de incubação (média ± desvio padrão, n= 3). Feira de Santana - BA, 2021.

O conteúdo de carboidratos presente nos explantes foliolares que são utilizados durante a inoculação originam-se da planta doadora, que em razão do cultivo heterotrófico, absorveu a sacarose disponível no meio de cultura. Dessa forma, o aumento dos teores de AST e sacarose observado durante a fase lag e início da fase exponencial, pode ter ocorrido, certamente, em virtude da degradação do amido armazenado nos cloroplastos do explante foliar, em sacarose, assim como também pode ter havido absorção de carboidratos do meio de cultura para serem utilizados no crescimento, visto que esta é uma fase de preparação para este objetivo (SILVA et al., 2020). O amido é o principal carboidrato de reserva nas plantas, e condições de escuro dão início à degradação do amido dos cloroplastos para manter a exportação de sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2017).

O início da fase exponencial é caracterizado pela intensa divisão celular visando a fase posterior, dessa forma, no 28º dia, final da fase exponencial, verificou-se redução no conteúdo de sacarose e conseqüentemente do AST, indicando que a sacarose foi possivelmente utilizada na síntese de proteínas e/ou açúcares estruturais como a celulose (SILVA et al., 2020). Em culturas de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth foi verificado que os teores dos açúcares solúveis totais (AST) dos calos se mantiveram baixos até o 7º dia de cultivo, sendo o acúmulo máximo registrado no 14º dia, havendo declínio no teor a partir desse ponto; já para os AR a análise demonstrou que os teores foram baixos inicialmente, aumentando progressivamente do 7º ao 21º dia, seguido de declínio a partir desse ponto (SOUSA, 2015). Em calos de *Byrsonima intermedia* os teores de AST apresentam tendência geral de declínio, apresentando conteúdo maior no dia da inoculação (NOGUEIRA et al., 2008).

A partir do dia 35º dia foi observado redução significativa no conteúdo de AST e de sacarose (Figura 14). O comportamento observado tem relação direta com a fase linear, caracterizada por atividade mitótica menor que a exponencial, todavia, trata-se de um período em que ainda há a necessidade de energia para os processos envolvidos no aumento da área celular que influenciam no acréscimo de peso dos calos. Segundo Santos et al. (2010), os carboidratos fornecem esqueletos de carbono e energia para a biossíntese de compostos orgânicos envolvidos no metabolismo celular, isso pode explicar o que provavelmente aconteceu no período de transição da fase exponencial à fase linear, tendo em vista a necessidade de carboidratos como fonte de energia; os mesmos autores estudando o comportamento dos carboidratos em calos de *Jatropha curcas* verificaram que os teores de AST se mantiveram baixos desde o dia da inoculação até os 77 dias de cultivo, oposto ao ocorrido neste estudo.

Do 28º dia de cultivo em diante, o comportamento de acúmulo de carboidratos oscilou com tendência a declínio (Figura 14), provavelmente pela disponibilidade de sacarose no meio de cultura e pela redução da demanda energética, afinal, a etapa de intensa atividade celular já havia cessado, comportamento este que corrobora com as fases da curva de crescimento pois em seguida inicia-se a fase de desaceleração e declínio. Oposto ao que houve neste trabalho, em calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) durante 120 dias de cultivo, Nogueira et al. (2008) obtiveram um pico de AST aos 70 dias, e atribuíram tais resultados à absorção da glicose e frutose contidas em pequenas quantidades no meio de cultura e obtidas pela quebra da sacarose durante a autoclavagem.

## 5. CONCLUSÕES

Explantos foliolares de *C. pyramidale* são competentes para indução de calos quando estimulados com 5,0 de  $\mu\text{M}$  BAP, 7,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina.

O pulso de auxina em explantes foliolares de *C. pyramidale* pode ser uma alternativa para indução de calos, entretanto, as análises histoquímicas não revelaram características que indicassem estímulo a embriogênese somática.

A curva de crescimento dos calos de *C. pyramidale* apresenta forma sigmoideal com cinco fases distintas (lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio) em 77 dias de cultivo. Do 21° ao 42° dia de crescimento dos calos, estes apresentavam células com características similares às aquelas consideradas meristemáticas, todavia, sugere-se novos estudos.

Os açúcares redutores apresentam comportamento decrescente durante o período de estudo, não sendo verificados a partir do 21° dia de cultivo. O conteúdo de sacarose e açúcares solúveis totais possuem comportamento que variam em função das fases de crescimento dos calos *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L.C. et al. Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipê-Branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v.33, p.45-56, 2010.
- ALMEIDA, L. V. S. et al. *Vernonia condensata* Baker: an alternative for large-scale seedling production. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.50:3, e20180941, 2020.
- ALVES, I. S. et al. 2- Isopentenyladenine in the induction of direct somatic embryogenesis capacity of *Coffea arabica* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.48:11, e20180001, 2018.
- ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicais.**, Botucatu, v. 13, especial, p. 533-538, 2011.
- BARRUETO, P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p.
- BARTOS, P.M.C. et al. Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L.. **3 Biotech** 8, 209 (2018).
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.381-390, 2006.
- BERTOZZO, F; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro* **Ciência e agrotecnologia.**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.

- BONA, C. M.; SANTOS, G. D; BIASI, L. A. *Lavandula* calli induction, growth curve and cell suspension formation. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias. Recife**, v.7, n.1, p.17-23, 2012.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**, 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga#:~:text=do%20menu%20principal,Caatinga,o%20norte%20de%20Minas%20Gerais>. Acesso em: 20 Mar. 2020.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, 1998, p. 87-132.
- CAMPOS, J. M. S et al. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, Brasília, v.44, n.1, p.38-44, 2009.
- CARDOSO, J. C; GERALD, L. T. S; SILVA, J. A. T. Micropropagation in the Twenty-First Century. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815, 2018.
- CARNEIRO, F. S. et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 2014, p. 294–303, 2014.
- CARNEROS, E. et al. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 2, p. 165–178, 2009.
- CASTRO, A. H. F. et al. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.
- COPELAND, K. K. P. G. **Calogênese e uso de fatores abióticos e bióticos na produção de metabólitos secundários da catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.)**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da saúde. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador. 2015.
- COSTA, F. H. S; LOUREIRO, T. S; PEREIRA, J.E.S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica.**, Fortaleza, v. 39, n. 02, p. 269-274., 2008.
- COSTA et al. Kinetin and 6-benzyladenine induce different morphogenetic responses in cotyledonary segments of *Royal poinciana*. **Ornamental Horticulture**. V. 25, No. 3, p. 270-275, 2019.
- FAISAL, M. et al. An Efficient and Reproducible Method for in vitro Clonal Multiplication of *Rauvolfia tetraphylla* L. and Evaluation of Genetic Stability using DNA-Based Markers. **Applied Biochemistry Biotechnology** 168:1739–1752, 2012.
- FEITOSA, L. S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

- FERREIRA, L. T. et al. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, 12(2)46-52, 2016.
- FERREIRA, E. A; PASQUAL, M; RESENDE, J.C. Calogênese em plântulas de Figueira. **Revista Ceres**. Universidade Federal de Viçosa-MG, 2007.
- FLORES, R. et al. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de Ipomoea batatas. **Revista de Ciências Agrárias**, 2015, 38(3): 429-437.
- FRANÇA, A. A. et al. Potential and restrictions of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz as native forage in the Brazilian semi-arid region. *Acta Scientiarum*. **Animal Sciences**, v. 42, e47460, 2020.
- GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: E.F George, M.A Hall & G-J Klerk (eds), **Plant Propagation by Tissue Culture: the background**. Vol. 1. 3.ed., Springer, Dordrecht, p. 2–28. Reino Unido, 2008.
- GOMES-COPELAND et al. *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27. 525–528, 2017.
- GOMES-COPELAND et al. Effect of elicitors in *Poincianella pyramidalis* callus culture in the biflavonoid biosynthesis. **Industrial Crops & Products**. V. 126 421–425, 2018.
- GRANDO, M. F. et al. Immature tassels as alternative explants in somatic embryogenesis and plant regeneration in south Brazilian maize genotypes. **Acta Scientiarum Agronomy** Maringá, v. 35, n. 1, p. 39-47, 2013.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2020.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. v. 2. p. 533-568.
- KHAN, T et al. Production of biomass and useful compounds through elicitation in adventitious root cultures of *Fagonia indica*. **Industrial Crops & Products** 108, 451–457, 2018.
- KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones, 2ª Ed., Davies P. J. (Ed)., **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 774 – 796. 1995.
- KRISHNAN, S. R. S.; SIRIL, E. A. Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in *Oldenlandia umbellata*. **L. Physiology and Molecular Biology OF Plants**. 23:471-5, 2017.
- LIMA, A. P. P. S; BRITO, A. L; SANTANA, J. R. F. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.50:2, e20180922, 2020.
- LINO, L. S. M. et al. Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.10, p.1325-1330, 2008.

- LLOYD, G; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Horticultural Science**, Alexandria. v. 15, p. 415. 1980.
- LOIOLA, M. I. B. et al. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 59-70, 2010.
- LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha. **Agrária**, v.11, n.1, p.21-25, 2016.
- MACIEL, A. L. R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Obatã. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.1, p.107-116. 2003.
- MACIEL, S. A. et al. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 263-267, 2010.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 2.ed. Printcolor Gráfica e Editora, Fortaleza, 2012. 413 p.
- MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar: potencial de uso em mudas submetidas a deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate**. 67p. 2003. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003.
- MASCARENHAS, L. M. S; SANTANA, J. R. F; BRITO, A. L. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, e55603, 2019.
- MATIAS, J. R; SILVA, F.F.S; DANTAS, B.F; Catingueira-verdadeira *Poincianella pyramidalis* [Tul.] L.P.Queiroz. Comitê Técnico de Sementes Florestais (CTSF), **Nota Técnica** n° 6, 2017.
- MENEZES, T. S. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Geintec**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.182-211. 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MITROFANOVA, O. V. et al. In vitro adventitious shoot regeneration from leaf explants of some apricot cultivars. **Ciência e agrotecnologia** vol.43. Lavras, June 03, 2019.
- MOURA, L. C. et al. Effects of explant type, culture media and picloram and dicamba growth regulators on induction and proliferation of somatic embryos in *Eucalyptus grandis* x *E. Urophylla*. **Revista Árvore**. 41(5):e410502, 2017.
- MOURA, L. C. et al. Auxin pulse in the induction of somatic embryos of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**; 43(3):e430302, 2019.
- MURARO, D. et al. The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Theoretical Biology** 317 (2013) 71–86.

- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. 15:473-497. 1962.
- NAVROSKI, M. C; WALDOW, D. A. G; PEREIRA, M. O; PEREIRA, A. O. Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Saturejahortensis* L.). **Revista Agroambiente**, v. 6, n. 3, p. 228-234, 2012.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras; v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48, 2008.
- NORDSTRÖM, A. et al. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 101, p. 8039-8044, 2004.
- OLIVEIRA, R. C. et al. Regulators, culture média and types of lights *in vitro* lavender culture. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49:11, e20180966, 2019.
- ORNELLAS, T. S. et al. Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**., Goiânia, v. 49, e55450, 2019.
- PAN, Y. et al. Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. **PLoS ONE** 15(2): e0220084. 2020.
- PELEGRINI, L. L. et al. Somatic embryogenesis and morphoanatomy of *Ocotea porosa* somatic embryos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 4, p. 595-605, 2013.
- PEREIRA, J. A. F. et al. Somatic embryos from *Phalaenopsis classic* Spotted Pink (Orchidaceae) protocorms. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49:07, e20180822, 2019.
- PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B.; Citocininas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.212-234.
- PHILLIPS, G. C; GARDA, M. Plant tissue culture média and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** (2019) 55:242–257.
- QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 467 p.
- REIS, A. et al. Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **Hoehnea** v. 44, n. 1, p. 90-95, 2017.
- ROCHA, P. S. G. et al. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**. vol.11 no.2 Bogotá, 2017.
- RODRIGUES, F. R. et al. *In vitro* callus induction and development of *Vernonia condensata* Baker with embryogenic potential. **Ciência e Agrotecnologia**, 44:e026719, 2020.

- SÁ, J. F. et al. Meios de cultura para a multiplicação de espécies selvagens de *Manihot*. **Ciência e Agrotecnologia**, 42 (6): 598-607, 2018.
- SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix (Salix humboldtiana Willd)*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.510-514, 2005.
- SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, D. N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v.40, n.11, 2010.
- SANTOS, M. R. A. et al. Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & c. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.10, n.2, p. 41-46, 2014.
- SANTOS, M. R. A. et al. Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.142-148, 2016.
- SANTOS, M. R. A.; SOUZA, C. A.; PAZ, E. S. Growth pattern of friable calluses from leaves of *Capsicum annum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 523-530, 2017.
- SHARMA, S. K.; BRYAN, G. J.; MILLAM, S. Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 7, p. 945–950, 2007.
- SILVA, A. S. et al. BAP, 2,4-D e ácido acetilsalicílico na indução e diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica*. **Ciência e agrotecnologia.**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1205-1212, 2009.
- SILVA, T. S. **Morfogênese e conservação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.** 2012. 88f. Dissertação - (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. 2012.
- SILVA, T. S. **Morfogênese *in vitro* e triagem fitoquímica de *Myracrodruon urundeuva* FR. ALL.** 2017. 104f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana. 2017.
- SILVA, T. S. et al. *In vitro* conservation of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz under minimal growth conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, 43:e014519, 2019.
- SILVA, T. S. et al. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal.**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020.
- SHARMA, S. K; BRYAN, G. J; MILLAM, S. Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. **Plant Cell Reports** 26:945–950, 2007.

- SILVEIRA, V. et al. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 3, p. 351–364, 2013.
- SMERTENKO, A; BOZHKOVA, P.V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 5, pp. 1343–1360, 2014.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- SMOZINSKI, C. V.; SANTOS, M. R.A. Indução de calos em explantes foliares, nodais e entrenodais de *Capsicum chinense* jacq. cultivar “guaraci cumari do pará”. SAJEBTT, Rio Branco, UFAC v.6, n.1, p. 145-155, 2019.
- SOUSA, F. P. **Micropropagação de de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae)**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2015.
- SOUZA, P. G. **Indução e padrão de crescimento de calos friáveis de *Capsicum annum* cv. Pimentão Amarelo**. 2016. 40fls. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho – Rondônia. 2016.
- SOUZA, J. C; RESCAROLLI, C. L. S; NUNEZ, C. V. Production of secondary metabolites by plant tissue culture. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 12(3): 269-280, 2018.
- SOUZA, M. D. et al. Multiplicação in vitro de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.Queiroz sob Diferentes Concentrações de Isopenteniladenina. X **Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**, Petrolina, PE, 2015.
- SOUZA, N. M. et al. Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore** vol.42 no.6 Viçosa. 2018.
- STEIN, V. C. et al. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.
- STEINER, N. et al. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 487–501, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p.
- TEIXEIRA, N. C. et al. Efeito do estresse hídrico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* TUL. (Leguminosae-caesalpinioideae). In: VII CONGRESSO DE ECOLOGIA DE BRASIL. **Anais**. Caxambu – MG: SEB, 2007. p. 1-3. Disponível em <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/374.pdf>>. Acesso em 18.11.2020.
- VALE, E. M. et al. Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome Science** 12:37, p. 3-17, 2014.

- VARGAS, D. P et al., Esterilização química para o cultivo in vitro de porta-enxerto de pessegueiro. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n.1. p.01-06. 2016.
- VASCONCELOS, J. N. C. et al. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.592-597, 2012.
- VILELA, M. S. P. et al. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Revista Árvore**; 43(1):e430106 2019.
- WERNER, E. T et al., Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta botânica brasileira**. 24(4): 1046-1051. 2010.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Critical Reviews in Plant Science**, 29:1, 36-57. 2010.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.
- ZAYTSEVA, Y. G.; POLUBOYAROVA, T. V.; NOVIKOVA, T. I. Effects of thidiazuron on in vitro morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants. **Morphogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. 52:56–63, 2016.