

Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.

Callogenesis in *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.

Tecla dos Santos Silva^I,
Rosembrando Sosthenes Leite Carvalho Filho^{II},
Tamara Torres Tanan^I, Thaylane Carneiro Rocha^{III},
José Raniere Ferreira de Santana^{IV}

Resumo

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma árvore que pertence à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão; possui potencial para utilização madeireira e medicinal, entretanto está ameaçada de extinção. Este trabalho objetivou estudar a calogênese da aroeira-do-sertão, bem como analisar bioquimicamente os calos produzidos, visando estudos posteriores em embriogênese somática. Explantes foliares foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM) de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), (0,0; 2,5 e 5,0 μM) CIN (cinetina) e (0,0; 0,34; 0,68 e 1,37 μM) glutamina. Para a curva de crescimento, pesou-se a massa fresca dos explantes com e sem calos até o 56º dia de cultivo, em intervalos de 7 dias. Foram determinados os açúcares redutores (AR), a sacarose e os açúcares solúveis totais (AST) em cada período da curva de crescimento. A utilização de 2,4-D é eficiente para a indução de calos em *Myracrodruon urundeuva* e a calogênese é potencializada com a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina no meio nutritivo. A curva de crescimento dos calos de *Myracrodruon urundeuva* apresenta forma sigmoidal com cinco fases: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O conteúdo de sacarose e AST apresentou comportamento distinto de acordo com as diferentes fases de crescimento dos calos, exibindo acúmulo de açúcares no período de preparação para o crescimento, degradação na fase exponencial e nova fase de acumulação nos estágios finais (desaceleração e estacionária). O conteúdo de AR, excetuando o dia "zero", se manteve estável durante todos os períodos avaliados. Os calos de *Myracrodruon urundeuva* possuem potencial embriogênico, no entanto sugerem-se novos estudos para obtenção de embriões somáticos, bem como identificação do período em que os mesmos serão formados.

Palavras-chave: Aroeira-do-sertão; Carboidratos; Planta medicinal; Cultivo *in vitro*

^I Bióloga, Dra., Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, CEP 44036-900, Feira de Santana (BA), Brasil. silva.tecla@gmail.com (ORCID: 0000-0003-4188-3439) / tamara.tanan@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-3142-6632)

^{II} Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, CEP 44036-900, Feira de Santana (BA), Brasil. eagronomocarvalho@gmail.com (ORCID: 0000-0001-5465-6804)

^{III} Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, CEP 44036-900, Feira de Santana (BA), Brasil. thaylane.car@hotmail.com (ORCID: 0000-0002-8562-3498)

^{IV} Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, CEP 44036-900, Feira de Santana (BA), Brasil. jose.raniere@gmail.com (ORCID: 0000-0003-0186-6888)



Abstract

Myracrodruon urundeuva Fr. All. is a tree belonging to the family Anacardiaceae, popularly known as 'aroeira-do-sertão', which has potential for wood production and medicinal purposes but it is threatened with extinction. This work investigated the callogenesis of the species and biochemically analyzed the calli produced, aiming at further studies of somatic embryogenesis. Leaf explants were inoculated in MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0.0, 2.5, 10.0 and 20.0 μM), kinetin (0.0, 2.5 and 5.0 μM) and glutamine (0.0, 0.34, 0.68 and 1.37 μM). For the growth curve, the fresh mass of explants with and without calli was determined until the 56th day of culture, at intervals of 7 days. Reducing sugars (RS), sucrose and total soluble sugars (TSS) were measured at each growth curve period. The use of 2,4-D was efficient for callus induction in *Myracrodruon urundeuva*, and callogenesis was enhanced with the combination of 2,4-D, KIN and glutamine in the nutrient medium. The growth curve of the calli presented sigmoidal shape with five distinct phases: lag, exponential, linear, deceleration and stationary. The content of sucrose and TSS presented different behavior according to the different stages of callus growth, exhibiting accumulation of sugars in the period of preparation for growth, degradation in the exponential phase and once again accumulated these carbohydrates in the final stages (deceleration and stationary). The RS content, except day zero, remained stable during all evaluated periods. The calli of *Myracrodruon urundeuva* have embryogenic potential, but further studies are suggested to obtain somatic embryos, as well as to identify the period in which they are formed.

Keywords: Aroeira-do-sertão; Carbohydrates; Medicinal plant; *In vitro* culture

Introdução

A família Anacardiaceae é constituída por, aproximadamente, 81 gêneros e 800 espécies presentes em ambientes secos e úmidos (PELL *et al.*, 2011). Dentre as espécies que constituem essa família, tem-se *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., uma árvore popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (LIMA, 2011), cujo porte varia correspondentemente com a região onde é encontrada. Sua madeira caracteriza-se como pardo-avermelhada, com sabor adstringente, muito dura e tida como imputrescível, com utilização na indústria civil; a casca é subdividida em placas nos troncos mais velhos, sendo íntegra nas árvores jovens, encerrando 15% de tanino, com utilização na indústria de curtume (ANDRADE *et al.*, 2000). A aroeira-do-sertão possui ainda uso medicinal, a qual, segundo Bezerra *et al.* (2016), atua como adstringente, antialérgica, anti-inflamatória e cicatrizante. Por via oral, os mesmos autores relatam que a espécie pode atenuar e até curar gastrite, úlceras estomacais e do duodeno; para uso tópico, é indicada no tratamento de ferimentos infeccionados da pele e de mucosas, como gengivites, faringites e amigdalites, e infecções do aparelho genital feminino.

Devido aos diversos usos atribuídos à espécie, esta vem passando por um processo de exploração intenso, de forma predatória, causando a devastação de suas populações naturais e, portanto, sendo considerada uma espécie ameaçada de extinção (BRASIL, 2008). Dentro desse contexto, a cultura de tecidos vegetais, cujas técnicas baseiam-se na capacidade da célula vegetal regenerar um indivíduo completo, surge como uma alternativa competente de propagação, possibilitando, por exemplo, a criação de um banco ativo de germoplasma *in vitro*. A utilização desse recurso biotecnológico, que é a cultura de tecidos vegetais, representa uma ferramenta valiosa para a propagação da aroeira-do-sertão, podendo ser utilizada para produção de mudas em larga escala, diminuindo assim a pressão no ambiente natural causada, dentre outros, pelo extrativismo da espécie.

Em meio às técnicas de cultura de tecidos vegetais, tem-se a micropropagação, a qual permite a obtenção de plantas livres de patógenos, exigindo menor espaço para produzir maior número de mudas ao longo de todo o ano, independente de mudanças sazonais (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). A micropropagação pode ser realizada, dentre outras técnicas, por organogênese ou embriogênese somática as quais podem ocorrer por duas vias: direta, por meio de células diferenciadas de um tecido vegetal sem a proliferação de calos, apresentando alta

fidelidade genética; e indireta, quando o processo de regeneração é antecedido pela formação de calo (LEMOS, 2015). O calo caracteriza-se como tecidos desdiferenciados (GUERRA *et al.*, 2016), sendo que o tipo de calo formado em um determinado genótipo, assim como seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênético, dependem, sobretudo, do explante, meio de cultura e fitorreguladores, podendo diferir em relação à textura, consistência e coloração (NOGUEIRA, 2015).

As atividades inerentes à cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas, visando, entre outros fatores, a otimização das respostas aos estímulos térmicos e fotoperíodo aplicados ao material *in vitro* (TEIXEIRA; TORRES, 1998). Na obtenção dos processos morfogênicos *in vitro* são utilizados os fitorreguladores, como as auxinas e citocininas, os quais possuem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados dos locais produtores na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos e, em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica quando se cultiva o explante em meio com 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), no entanto, em alguns casos o uso de citocininas também favorece a produção de calo embriogênico (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Além dos reguladores vegetais, os aminoácidos e amidas têm importância na amplificação das respostas morfogênicas, os quais proporcionam maior crescimento e facilitam a diferenciação no sentido da regeneração; nesse contexto tem-se a amida L-glutamina que é benéfica na obtenção de embriões somáticos (QUISEN; ANGELO, 2008).

A caracterização morfológica, bioquímica e ultra-estrutural dos calos pode evidenciar as mudanças que ocorrem nas diferentes fases de crescimento dos mesmos, fornecendo informações importantes relacionadas ao processo morfogênético *in vitro* de tecidos vegetais; esses estudos podem auxiliar ainda na identificação de fatores que desencadeiam mudanças fisiológicas nos explantes, como a aquisição da friabilidade ou desenvolvimento de embriões somáticos (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Durante o cultivo *in vitro* destaca-se ainda a relevância de estabelecer a curva de crescimento de calos da espécie vegetal estudada, cuja importância está justamente no reconhecimento das fases em que ocorrem processos essenciais ao estudo cinético do seu crescimento (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Estudos de calogênese em *Myracrodruon urundeuva* foram realizados por Vasconcelos *et al.* (2012) com a utilização de 2,4-D, no entanto os autores relataram que os calos obtidos apresentaram textura compacta e características não-embriogênicas.

Nesse sentido, este trabalho objetivou estudar a calogênese *Myracrodruon urundeuva*, bem como analisar bioquimicamente os calos produzidos, visando estudos posteriores em embriogênese somática.

Metodologia

Local de realização dos experimentos e obtenção do material vegetal

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) e no Laboratório de Germinação (LAGER) localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Para o estabelecimento das culturas *in vitro* foram utilizadas sementes de *Myracrodruon urundeuva* provenientes da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Semiárido, localizada em Petrolina-PE. O estabelecimento do cultivo *in vitro* foi baseado na metodologia utilizada por Andrade *et al.* (2000) com modificações. Os frutos-semente da espécie foram desinfestados superficialmente em água corrente com algumas gotas de detergente neutro por 20 minutos, em seguida foi feita a remoção do endocarpo através de fricções em peneira e por fim permaneceram por mais 10 minutos em água corrente. Em câmara de fluxo laminar, as sementes

foram desinfestadas com imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos, sendo, posteriormente, lavadas por três vezes consecutivas com água destilada estéril. Após esse processo, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 87,64 mM de sacarose e solidificado 7 g. L⁻¹ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 (utilizando NaOH ou HCl 0,1N) antes da autoclavagem à temperatura de 121 °C por 15 minutos. Após a inoculação os tubos foram vedados com película de polivinilcloreto (PVC).

Indução de calos

Foram utilizados como explantes os segmentos foliares (seccionados nas extremidades longitudinais) com ± 0,5 cm² oriundos de plantas germinadas *in vitro* com aproximadamente 70 dias de idade. Estes foram excisados em solução de ácido ascórbico (1,14 mM) previamente autoclavada, permanecendo imersos por 10 minutos e então inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 87,64 mM de sacarose e diferentes concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM) de 2,4-D, (0,0; 2,5 e 5,0 µM) CIN (cinetina) e (0,0; 0,34; 0,68 e 1,37 µM) glutamina. O meio de cultura foi solidificado com 7 g. L⁻¹ de ágar e teve seu pH ajustado para 5,7 ± 0,1 (utilizando NaOH ou HCl 0,1N) antes da autoclavagem à temperatura de 121 °C por 15 minutos. Após a inoculação, as placas foram vedadas com película de PVC.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 x 4 (concentrações de 2,4-D, concentrações de CIN, concentrações de glutamina), totalizando 60 tratamentos. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco unidades experimentais – cinco explantes por placa de Petri).

As culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de 25 ± 3 °C, na ausência de luz por 45 dias e em seguida foram avaliadas: a porcentagem dos explantes que formaram calos, massa fresca dos explantes com e sem calos, a porcentagem de explantes que apresentaram formação de estruturas com formas globulares, coloração [Branco, verde, marrom e escuro (cinza, preto e aspectos oxidados)] e textura (friável ou compacto).

Curva de crescimento de calos

Para realização da curva de crescimento dos calos foi utilizado o tratamento contendo 2,5 µM de 2,4-D combinado com 2,5 µM de CIN e 0,34 µM de glutamina. Essa curva foi baseada na metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2008) com modificações, a qual foi determinada pela quantificação da massa fresca (mg) dos explantes com e sem calos formados, a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) até 56 dias, em intervalos de 7 dias, totalizando 9 períodos. Foram utilizadas quatro repetições (placas de Petri), sendo cada repetição composta por cinco unidades experimentais (cinco explantes). A curva de crescimento foi realizada a partir da média das quatro repetições e para cada repetição foi realizada a média dos cinco explantes em cada período de avaliação. O percentual de crescimento dos calos foi determinado pela equação: $Pf - Pi / Pf \times 100$ onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997).

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). Para determinação dos açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST) e

sacarose, foram utilizados 100 mg de explantes frescos (com e sem calos) macerados com auxílio de almofariz e pistilo em 10 mL de água destilada. Em seguida foram colocados em tubos de centrífuga e permaneceram em banho-maria à temperatura de 40°C por 30 minutos e, logo após, centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado ($\pm -6^\circ\text{C}$) 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 a 540 nm para AR e 620 nm para AST. As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicadas pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida realizou-se a análise de variância, sendo então transformados pela função $(x + 1)^{0,5}$, exceto os dados de porcentagem, os quais foram submetidos à transformação em arco-seno. Quando o valor de “F” foi significativo, testou-se as médias originais pelo Teste Scott-Knott.

Resultados e discussão

Indução de calos

A análise de variância revelou que a interação tripla “2,4-D x CIN e glutamina” apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis analisadas. Ao analisar a porcentagem de explantes responsivos para formação de calos, observou-se que em meio isento de CIN e adicionado com 2,5 μM dessa citocinina, registrou-se elevadas taxas para esta variável na maioria dos tratamentos que conteve a auxina, ao passo que em meio ausente de glutamina, atingiu-se porcentagens de 100% de responsividade em todos os tratamentos adicionados com 2,4-D (Tabela 1). Quando o meio de cultura foi suplementado com 5,0 μM de CIN, também foram registradas elevadas taxas de explantes responsivos para formação de calos na maioria dos tratamentos, atingindo 100% em grande parte dos que continham 2,4-D (Tabela 1).

Os resultados demonstraram que a adição de 2,4-D teve efeito positivo na indução de calos em *Myracrodruon urundeuva*, visto que, com exceção do tratamento isento de 2,4-D, CIN e glutamina (4,0%) e do tratamento contendo apenas CIN na concentração de 5,0 μM (4,0%), não houve formação de calos em meio de cultura isento da auxina (Tabela 1).

Para a massa fresca dos calos verificou-se que na ausência de CIN foi obtido valor médio de 91,58 mg com a utilização de 2,5 μM de 2,4-D combinado com 0,34 μM de glutamina, não diferindo das demais médias (86,71; 72,27 e 74,10 mg) registradas com o uso da mesma concentração de 2,4-D em meio de cultura isento e adicionado com 0,34, 0,68 e 1,37 μM de glutamina, respectivamente, assim como não diferiu dos valores médios (67,03 e 73,67 mg) alcançados com 0,34 μM de glutamina combinada com 5,0 e 10,0 μM de 2,4-D, respectivamente (Tabela 2).

Os resultados alcançados no presente estudo são superiores aos relatados por Vasconcelos *et al.* (2012) em trabalhos de calogênese com a mesma espécie, no qual os autores obtiveram as maiores médias (87,50 e 82,50%) com a utilização de 4,52 e 6,78 μM de 2,4-D, respectivamente.

Tabela 1 – Porcentagem de explantes responsivos para formação de calos obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação submetidos a diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina

Table 1 – Responsive explant percentage for callus formation from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Leaf explants at 45 days of inoculation submitted to different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), kinetin (KIN) and glutamine

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	4,00aB	0,00aC	0,00aC	0,00aB
2,5	100,00aA	100,00aA	100,00aA	96,00aA
5,0	100,00aA	72,00bB	56,00cB*	96,00aA
10,0	100,00aA	88,00aA	52,00bB*	100,00aA
20,0	100,00aA	100,00aA	96,00aA	100,00aA
2,5 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aB
2,5	100,00aA	100,00aA	100,00aA	100,00aA
5,0	100,00aA	40,00bB*	100,00aA*	100,00aA
10,0	100,00aA	100,00aA	84,00bA*	100,00aA
20,0	100,00aA	100,00aA	96,00aA	100,00aA
5,0 μM CIN				
0,0	4,00aB	0,00aC	0,00aC	0,00aB
2,5	92,00aA	80,00aB*	100,00aA	92,00aA
5,0	92,00aA	72,00bB	84,00bB*	100,00aA
10,0	100,00aA	100,00aA	100,00aA*	100,00aA
20,0	92,00aA	100,00aA	100,00aA	100,00aA

Fonte: Autores (2017)

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Os resultados observados neste trabalho corroboram aqueles reportados por Lopes *et al.* (2016) em culturas de *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, submetidas às concentrações de 2,4-D e glutamina, que também constataram efeito positivo da presença dessa auxina em meio de cultura para indução da calogênese e assim como foi verificado para *Myracrodruon urundeuva*, os autores relataram que as distintas concentrações de glutamina não influenciaram na formação dos calos.

Tabela 2 – Massa fresca dos explantes (mg) com e sem calos obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina

Table 2 – Fresh mass of explants (mg) with and without calli obtained from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Leaf explants at 45 days of inoculation with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), kinetin (KIN) and glutamine

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	34,67aB	10,11aB	22,10aB	12,67aC
2,5	86,71aA	91,58aA	72,27aA*	74,10aA*
5,0	70,92aA	67,03aA	26,98bB*	71,02aA
10,0	65,60aA	73,67aA	36,39bB	67,52aA
20,0	37,92aB	37,78aB	52,71aA	44,65aB
2,5 μM CIN				
0,0	30,08aB	10,05aB	23,44aC	25,52aB
2,5	66,68cA	97,10bA	166,73aA*	106,70bA*
5,0	73,93aA	32,66bB	79,93aB	47,63bB
10,0	61,28aA	72,31aA	62,59aB	75,77aA
20,0	44,08bB	28,56bB	40,90bC	98,19aA*
5,0 μM CIN				
0,0	36,51aB	14,73aB	19,55aC	19,12aC
2,5	56,24bB	78,63bA	113,96aA*	41,21bC*
5,0	82,52bA	45,33cB	82,76bB	144,15aA*
10,0	50,87bB	79,30bA	112,41aA*	64,89bB
20,0	41,84aB	43,23aB	66,48aB	70,29aB

Fonte: Autores (2017)

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Outros autores já descreveram o efeito positivo da combinação de auxinas e citocininas na indução de calos, a exemplo de Reis *et al.* (2017) que ao combinar o uso 2,4-D com CIN sob distintos

explantes (segmento foliar e internodal) de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, relataram taxa máxima (100%) de formação de calos em explantes foliares no período de 30 dias com a utilização de 4,53 μM de 2,4-D combinado com 4,65 μM de CIN. Já Santos *et al.* (2016) verificaram a maior porcentagem (100%) de indução de calos em folhas *Piper permucronatum* Yunck. combinadas com 4,52 μM de 2,4-D e 4,44 μM de BAP.

O comportamento observado para *Myracrodruon urundeuva* na presença de 2,4-D deve-se, certamente, ao fato de que as auxinas, entre elas o 2,4-D, são consideradas responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), o que conseqüentemente favorece a calogênese. Essas características são requeridas quando se objetiva a indução de calos, visto as particularidades que essa estrutura apresenta. É importante destacar que além dos estímulos exógenos necessários para indução da calogênese, deve-se considerar também a capacidade da célula vegetal em responder a tais estímulos. De acordo com Guerra, Torres e Teixeira (1999), os hormônios são compostos químicos endógenos facilmente transportados para células responsivas, onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica na transcrição e na tradução, em um vasto número de processos; nesse sentido, supõe-se que as células responsivas são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e então iniciam a resposta na célula. Dessa maneira, o tecido vegetal oriundo dos explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* mostra-se responsivo ao estímulo hormonal empregado para indução de calogênese.

Ao adicionar 2,5 μM de CIN no meio de cultura, constatou-se maior média (166,73 mg) para massa fresca quando os explantes foliares foram inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 μM de 2,4-D associado a 0,68 μM de glutamina. Ao acrescentar 5,0 μM de CIN no meio de cultura, averiguou-se média de 144,15 mg com a suplementação 5,0 μM de 2,4-D combinado com 1,37 μM de glutamina no meio de cultura (Tabela 2).

Os resultados obtidos para *Myracrodruon urundeuva* são inferiores aos observados por Lopes *et al.* (2016) em estudo com *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rosea, no qual foi alcançado uma média de 4.600 mg de matéria fresca de calos em meio de cultura adicionado com 18,12 μM de 2,4-D. Já Rocha (2014) em culturas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis verificou que ao combinar uma auxina (2,4-D) com uma citocinina (BAP) para indução de calos em explantes foliares constatou as maiores médias (18.190 mg de massa fresca) utilizando apenas a citocinina BAP (17,76 μM).

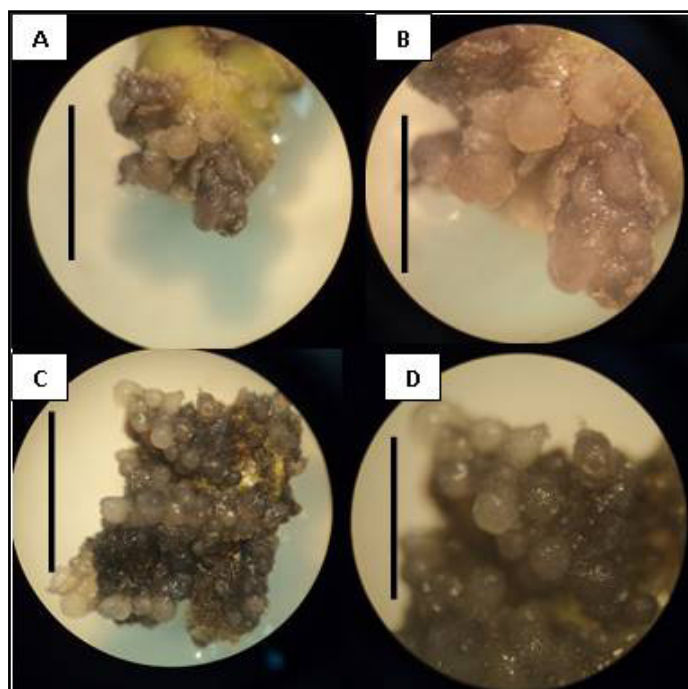
Detectou-se, através de análises morfológicas dos calos, a presença de estruturas globulares, de forma que foi contabilizada a porcentagem de explantes com tais formações. Trevizam *et al.* (2011) também relataram aspectos de estruturas globulares na superfície de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* com concentrações distintas de boro e cálcio. De acordo com os mesmos autores, as formas globulares associadas à superfície dos calos podem caracterizar a presença de organogênese e/ou embriogênese somática.

As estruturas globulares observadas no presente estudo apresentaram formatos semelhantes a embriões somáticos no estágio globular (Figura 1), no entanto são necessários outros estudos para confirmação da presença desses embriões. Nepomuceno (2012), em estudos com *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J. F. B. Pastore, também visualizou estruturas globulares em calos obtidos a partir de explantes foliares em meio suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de CIN.

Quando o meio de cultura esteve isento de citocinina CIN, obteve-se taxa de 60% de explantes com formações globulares com a combinação de 2,5 μM de 2,4-D com 1,37 μM de glutamina, no entanto, sem diferir estatisticamente dos demais valores (45,00; 30,00 e 36,00%) atingidos com a mesma concentração de 2,4-D combinada com as demais concentrações de glutamina (0,0; 0,34 e 0,68 μM), respectivamente (Tabela 3).

Figura 1 – Aspectos morfológicos de calos em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. após 45 dias de cultivo. A e B- 2,5 μ M de 2,4-D + 2,5 μ M de CIN + 0,34 μ M de glutamina; C e D- 2,5 μ M de 2,4-D + 0,0 μ M de CIN + 0,68 μ M de glutamina. Barras: 50 mm (A e C); 25 mm (B e D)

Figure 1 – Morphological aspects of calli of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. after 45 days of cultivation. A and B - 2.5 μ M 2,4-D + 2.5 μ M KIN + 0.34 μ M glutamine; C and D - 2.5 μ M 2,4-D + 0.0 μ M KIN + 0.68 μ M glutamine. Bars: 50 mm (A and C); 25 mm (B and D)



Fonte: Autores (2017)

Quando foi adicionado 2,5 μ M de CIN no meio de cultura, atingiu-se taxa máxima de explantes (100%) que apresentaram formações globulares com a suplementação de 2,5 μ M de 2,4-D em combinação com 0,34 μ M de glutamina, não diferindo estatisticamente da porcentagem (80%) registrada com a utilização de 1,37 μ M na mesma concentração de 2,4-D (Tabela 3). Ao ser acrescentado 5,0 μ M de CIN no meio de cultura, constatou-se maior taxa (80%) para a mesma variável com a junção de 20,0 μ M de 2,4-D e 0,34 μ M de glutamina, não apresentando diferença estatística do tratamento contendo 10,0 μ M da auxina na mesma concentração de glutamina, cuja taxa foi de 60% (Tabela 3).

Na maioria dos modelos de embriogênese induzidos *in vitro*, as auxinas e, entre elas o 2,4-D, são consideradas responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação e rediferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). No entanto, alguns autores têm relatado o uso de citocininas objetivando a produção de embriões somáticos, a exemplo de Carneiro *et al.* (2014) que observaram a indução de calos embriogênicos em *Agave sisalana* com a combinação de 2,4-D (13,6 μ M) com uma citocinina, que no estudo foi o BAP na concentração 88,8 μ M.

Apesar dos vários relatos disponíveis na literatura sobre a indução e desenvolvimento de embriões somáticos, ainda não existe um protocolo padrão para a indução e maturação de culturas embriogênicas em plantas (FLOH; SANTOS; DEMARCO, 2015). No presente estudo foi verificado que a adição de citocinina apresentou efeito positivo no aumento da presença de estruturas globulares nos calos de *Myracrodruon urundeuva*. De acordo com Taiz e Zeiger (2009), embora as citocininas regulem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal. Nesse sentido, apesar de não ter sido requerido para a indução de calos

na espécie vegetal estudada, sua presença favoreceu o aumento na produção de calos.

Além da adição de citocinina combinada com a auxina, o uso da glutamina também influenciou a indução de calos com formações globulares. Todavia, 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.

Tabela 3 – Porcentagem de explantes que apresentaram em sua morfologia formações globulares obtidas a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina (GLU)

Table 3 – Percentage of explants that presented morphology with globular formations obtained from leaf explants of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. at 45 days of inoculation with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), kinetin (KIN) and glutamine (GLU)

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB
2,5	45,00aA	30,00aA	36,00aA	60,00aA
5,0	4,00aB	8,00aB	0,00aB	4,00aB
10,0	4,00aB	0,00aB	4,00aB	4,00aB*
20,0	12,00bB	35,00aA*	0,00bB	8,00bB
2,5 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aC
2,5	54,00bB	100,00aA*	48,00bA	80,00aA
5,0	28,00aA	15,00aC	8,00aB	8,00aC
10,0	4,00bB	15,00bC	20,00bB	48,00aB
20,0	32,00bA	60,00aB	68,00aA*	88,00aA*
5,0 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aC
2,5	52,00aA	36,00bB	56,00aA	24,00bB*
5,0	20,00bB	28,00bB	12,00Bb	52,00aA*
10,0	0,00cB	60,00aA*	28,00Bb	45,00aA
20,0	4,00bB	80,00aA	12,00Bb	28,00bB

Fonte: Autores (2017)

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Em relação à coloração, os calos apresentaram-se com cores que variaram entre marrom,

verde e escuro (tons de cinza e preto, oxidados) na maioria dos tratamentos, sendo que maior parte destes apresentaram mais de uma cor representativa. A coloração escurecida encontrada na maioria dos calos de *Myracrodruon urundeuva* pode ser associada à oxidação observada durante o cultivo dos mesmos.

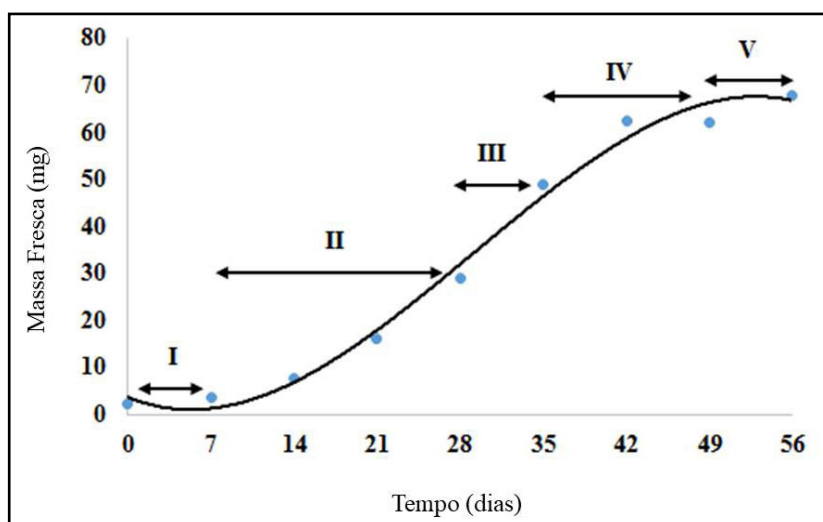
Em relação à textura, obtiveram-se calos friáveis, compactos e ainda calos com partes friáveis e compactas simultaneamente, sendo que grande parte dos tratamentos apresentou textura friável. Ao relacionar a coloração observada com a textura dos calos foi possível identificar que os calos com colorações mais escuras (marrons e escuros) apresentaram porcentagens maiores de calos friáveis e friáveis/compactos. Silva *et al.* (2018) constataram coloração heterogênea em estudo com *Caesalpinia ferrea*, como a presença de calos friáveis nas colorações “verde branco” e “verde claro” com a utilização da folha com fonte de explante. Diferente do observado neste estudo, Vasconcelos *et al.* (2012) observaram a predominância de calos marrons, compactos e indiferenciados, independente da concentração de 2,4-D utilizada em trabalho de calogênese com a mesma espécie. De acordo com os mesmos autores, para a obtenção de culturas embriogênicas é indispensável à indução de calos friáveis, por conter células arredondadas e com características meristemáticas.

Análise da curva de crescimento de calos embriogênicos

Ao analisar a curva de crescimento dos calos de *Myracrodruon urundeuva*, foi possível constatar o padrão sigmoidal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (Figura 2). Em estudos com a mesma espécie, Vasconcelos *et al.* (2012) também observaram padrão típico de crescimento de calos sigmoidal ao longo de 70 dias com tendência de ganho de massa seca até o 56º dia após a inoculação, caracterizando o início da fase de desaceleração.

Figura 2 – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 µM de 2,4D + 2,5 µM de CIN + 0,34 µM de glutamina durante 56 dias de incubação. Fase I- lag; Fase II- exponencial; Fase III- linear; Fase IV- desaceleração e Fase V- estacionária

Figure 2 – Growth curve of calli formed by *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Leaf explants inoculated in culture medium supplemented with 2.5 µM 2,4D + 2.5 µM KIN + 0.34 µM glutamine for 56 days of incubation. Phase I-lag; Phase II - exponential; Phase III-linear; Phase IV – deceleration, and Phase V- stationary



Fonte: Autores (2017)

Lopes *et al.* (2016) também verificaram cinco fases diferentes para a curva de crescimento de calos de *Hilocereus undatus* em um período de 112 dias, no entanto para essa espécie, as fases relatadas foram a exponencial, linear, estacionária, desaceleração e declínio. Diferente do averiguado para a aroeira-do-sertão, os mesmos autores não observaram a fase lag durante o período de avaliação. Para a espécie em estudo, essa fase ocorreu antes do 7º dia após a inoculação, cuja taxa foi de 33,86% de crescimento (Figura 2).

A fase lag é o período em que as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia (FEITOSA *et al.*, 2013). Durante esse período, verifica-se número estacionário de células, início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas, ou seja, ocorre uma preparação para a fase de divisão celular (STEIN *et al.*, 2010). Em estudos com *Jatropha curcas* L., Feitosa *et al.* (2013) verificaram que a fase lag permaneceu de 0 a 15 dias de cultivo, ao passo que Santos, Souza e Paz (2017) relataram que essa fase na curva de crescimento dos calos oriundos de folhas de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño ocorreu desde o dia da inoculação até o 12º dia de cultivo. Já 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 segunda fase, a exponencial, decorreu do 7º até o 28º dia, e foi constatado o crescimento de 87,24% (Figura 2). Durante essa fase foi possível observar o aumento considerável na taxa de crescimento dos calos da aroeira-do-sertão, isso ocorreu porque de acordo com Stein *et al.* (2010) é nesse período que acontece a máxima divisão celular. A fase exponencial observada em *Myracrodruon urundeuva* ocorreu precocemente quando comparada com a curva de crescimento de calos relatadas por Santos *et al.* (2016), obtida a partir de explantes foliares de *Piper permucronatum*, na qual a fase exponencial foi constatada do 21º ao 49º dia de cultivo. Já Santos, Souza e Paz (2017) descrevem que para a curva de calos de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño essa fase foi observada do 12º ao 25º dia. Para a espécie em estudo a formação de calos nos explantes foi observada a partir do 14º dia.

A fase linear foi observada entre o 28º e o 35º dia da inoculação, cujo percentual de crescimento foi de 40,95% (Figura 2). Nesse período a visualização das formações calosas nos explantes é bem evidente. O período da fase linear caracteriza-se como uma fase, na qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular (FEITOSA *et al.*, 2013). Para *Hilocereus undatus* esse período foi observado entre 14 e 28 dias (LOPES *et al.*, 2016). Ao analisar a fase de desaceleração da curva de crescimento dos calos de *Myracrodruon urundeuva*, observou-se que essa fase compreendeu o período de 35 a 49 dias, com crescimento de 21,31% (Figura 2). A fase de desaceleração é onde há maior produção de metabólitos secundários e é no final dessa fase que deve ser iniciado o processo de repicagem dos calos (GUERRA; NODARI, 2006). Para *Piper permucronatum* essa fase ocorreu entre o 56º ao 63º dia após a inoculação dos explantes foliares (SANTOS *et al.*, 2016).

Finalmente, a fase estacionária iniciou-se ao 49º dia e se manteve até o último período de avaliação (56º dia) (Figura 2). Essa fase pode ser caracterizada como praticamente imóvel em relação ao ganho de massa fresca, pois não há mais divisão celular, o calo está, portanto, em subsistência (LOPES *et al.*, 2016). Isso pode ser percebido inclusive com o próprio percentual de crescimento dos calos da aroeira-do-sertão que foi de apenas 8,25%. Feitosa *et al.* (2013) observaram que a fase estacionária dos calos de *Jatropha curcas* L. ocorreu entre 45 e 50 dias.

Análises do conteúdo de carboidrato

Através da análise do conteúdo de carboidratos durante os 56 dias de cultivo dos calos de *Myracrodruon urundeuva* foi possível detectar a presença de açúcares redutores (AR), sacarose e açúcares solúveis totais (AST) (Figura 3).

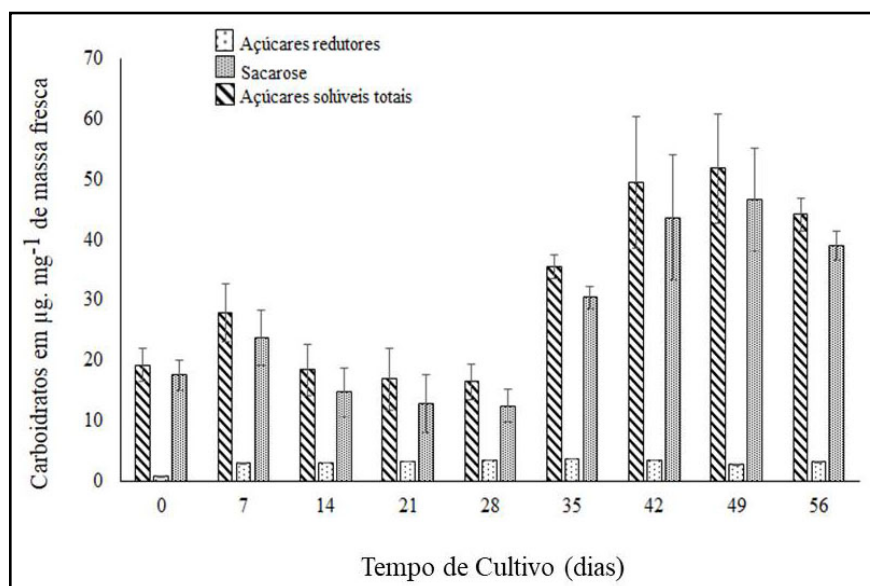
O menor conteúdo de carboidratos foi observado no período que compreendeu o dia “zero” e se estendeu até o 28º dia (Figura 3), coincidindo com as fases lag e exponencial (Figura 2). Os conteúdos de carboidratos se mantiveram semelhantes nas fases lag e exponencial, com

exceção dos açúcares redutores, os quais apresentaram menor conteúdo no dia da inoculação dos explantes (dia zero) tendo aumento a partir do dia 7, quando se iniciou a fase exponencial (Figura 3). Esse resultado é contrário ao observado por Santos *et al.* (2008) que ao analisarem o conteúdo de AR de calos oriundos de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' verificaram que o teor máximo 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.

Os açúcares encontrados nos explantes foliares analisados no dia da inoculação são oriundos da planta mãe doadora de explantes cultivadas *in vitro*, que em cultura heterotrófica absorveu carboidratos disponíveis no meio de cultura. Nesse sentido, durante o período da fase lag (0 a 7 dias), o aumento de AST, AR e sacarose observado pode ter ocorrido, provavelmente, por causa 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. 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, 2009). Entretanto, o teor de amido não foi avaliado neste estudo.

Figura 3 – Conteúdo de carboidratos dos calos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. formados a partir de explantes foliares inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 µM de 2,4-D + 2,5 µM de CIN + 0,34 µM de glutamina, durante 56 dias de incubação (média ± desvio padrão, n = 3)

Figure 3 – Carbohydrate content of calli of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. formed from leaf explants inoculated in culture medium supplemented with 2.5 µM 2,4-D + 2.5 µM KIN + 0.34 µM glutamine for 56 days of incubation (mean ± standard deviation, n = 3)



Fonte: Autores (2017)

No 7º dia, o conteúdo de sacarose e de AST foram superiores aos obtidos no 28º dia de cultivo (Figura 3), esses períodos correspondem ao início e final da fase exponencial, respectivamente. Sabe-se que no início dessa fase os explantes se preparavam para a etapa de intensa divisão por qual passariam na fase seguinte, de modo que os mesmos acumularam AST, AR e sacarose absorvendo do meio de cultura e/ou quebrando as reservas contidas no explante. Dessa maneira, no 28º dia, final da fase exponencial, percebeu-se que houve a redução do 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. Esses resultados diferem de Sousa (2015) em análise bioquímica de culturas de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., no qual foi observado que os teores dos 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. Para os AR, o mesmo autor relatou que a análise demonstrou que os teores também foram baixos inicialmente, aumentando progressivamente do 7º ao 21º dia, seguido de declínio a partir desse ponto.

Nogueira *et al.* (2008) em estudos calogênicos de *Byrsonima intermedia* constataram que os teores de AST, presentes nos calos oriundos de explantes foliares, apresentaram tendência geral de declínio, exibindo teores mais elevados no dia da inoculação. Os mesmos autores notaram que, esses teores declinaram até o 40º dia, ocorrendo um novo acúmulo até o 70º dia após a inoculação, seguido, novamente, de redução, sendo que essa elevação da concentração de AST nesse período de cultivo assim como observado para *Myracrodruon urundeuva* condiz com a fase de desaceleração na curva de crescimento dos calos.

A partir do 35º dia foi observado o aumento significativo do conteúdo de AST e de sacarose em comparação aos períodos anteriores, no entanto a quantidade de açúcares produzidos com 35 dias de cultivo são inferiores aos períodos seguintes (Figura 3). O comportamento observado aconteceu porque foi nesse período que se findou a fase linear e se iniciou a fase de desaceleração. A fase linear caracteriza-se por atividade mitótica menor que a exponencial, todavia continua a ocorrer acréscimo no peso dos calos, obtido provavelmente, pelo aumento da área celular. Santos *et al.* (2010) em estudos bioquímicos de *Jatropha curcas* analisando o conteúdo de carboidratos ao longo de 112 dias verificaram que os teores de AST se mantiveram baixos desde o dia da inoculação até o 77º dia de cultivo. Diferente do que foi verificado para *Myracrodruon urundeuva*, os mesmos autores relataram que os teores de AR observados inicialmente foram baixos até o 35º dia, apresentando posterior aumento do 63º até o 77º dia, sendo que ao término do cultivo os teores são elevados desde o 98º até o último dia.

Os conteúdos dos açúcares redutores, com exceção do período antes da inoculação (0 dias), mantiveram-se aparentemente estáveis ao longo do cultivo (Figura 3). Sabe-se que a sacarose é um açúcar de reserva prontamente disponível e estável para a planta, e sua hidrólise resulta nos açúcares redutores: frutose e glicose. Esses açúcares redutores provavelmente, assim que produzidos, foram metabolizados rapidamente para serem usados como fonte de energia e esqueleto de carbono para outras estruturas, de maneira que resultou nessa estabilidade observada nos níveis desses açúcares nos períodos de cultivo. Os açúcares redutores possuem um grupo aldeído ou cetona exposto, já em um açúcar não redutor, como a sacarose, o grupo cetona ou aldeído é reduzido a um álcool ou combinado com um grupo semelhante em outro açúcar (TAIZ *et al.*, 2017). Nesse sentido, os açúcares redutores podem sofrer reação de oxidação e, por conta dessas características, não são transportados pela planta, e se não forem logo utilizados, podem ser convertidos em sacarose, que é a forma estável de transporte.

Diferente do que foi observado neste estudo, Nogueira *et al.* (2007) observaram declínio de AR em *Byrsonima intermedia* do dia da inoculação até o 120º dia de cultivo. Os autores inferiram que esse decréscimo constante no teor desses açúcares indica que os calos da espécie utilizaram somente a reserva de AR contida no explante no dia da inoculação, oriundos da planta-mãe, pois assim como observado neste estudo, a fotossíntese estava ausente, visto que o cultivo foi realizado no escuro e de forma heterotrófica e, assim, o açúcar foi consumido para manter o crescimento.

Nos períodos seguintes, com 42 e 49 dias, o comportamento de acúmulo de carboidratos foi mantido estável. Entretanto, é possível verificar que o acúmulo de AST e sacarose são notavelmente maiores quando comparados com os períodos iniciais (Figura 3). Esses períodos estão compreendidos dentro da fase de desaceleração, provavelmente nessa fase houve absorção de sacarose do meio de cultura, porém o consumo foi menor, visto que a etapa de intensa atividade celular já havia cessado. Esse resultado corrobora Santos *et al.* (2010) em cultivo de *Jatropha*

curcas, no qual foi observado que tanto o AST quanto o AR apresentaram como tendência baixo teor a partir da inoculação e nível superior nos períodos finais de cultivo. Os resultados obtidos para *Myracrodruon urundeuva* permitem inferir que houve redução das atividades metabólicas nesse período, visto o acúmulo de AST e sacarose, além da inalteração do conteúdo de açúcares redutores, comportamento que se manteve no período seguinte (56 dias), confirmando a fase estacionária em que se encontrou o calo.

Conclusão

A utilização de 2,4-D é eficiente para a indução de calos em *Myracrodruon urundeuva*, sendo potencializada com a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina.

A curva de crescimento dos calos de *Myracrodruon urundeuva* apresenta forma sigmoidal; o conteúdo de sacarose e AST apresentam comportamento distinto de acordo com as diferentes fases de crescimento dos calos. O conteúdo de AR, excetuando o dia “zero”, se mantém estável durante o crescimento dos calos.

Os calos de *Myracrodruon urundeuva* possuem potencial embriogênico, no entanto sugerem-se novos estudos para obtenção de embriões somáticos, bem como identificação do período em que os mesmos serão formados.

Referências

- ANDRADE, M. W. de *et al.* Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/index.php/revistas/ciencia-e-agrotecnologia/artigos-publicados/10-volumes-revista/50-vol24numero1nova>. Acesso em: 2 jul. 2020.
- BEZERRA, E. S. *et al.* Plantas medicinais para uso humano. In: BARACUHY, J. G. de V. *et al* (org.). **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. 2. ed. rev. Campina Grande, PB: EDUFPG, 2016. 205p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303921323_Plantas_Medicinais_de_uso_comum_no_Nordeste_do_Brasil. Acesso em: 2 jul. 2020.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa MMA nº 6/2008**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 23 set. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascomboletins/arquivos/8319092008034949.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2015.
- CARNEIRO, F. dos S. *et al.* Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 294-303, jul./set. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pat/v44n3/a05v44n3.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2020.
- FEITOSA, L. S. *et al.* Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 370-377, mar./abr. 2013. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14007>. Acesso em: 2 jul. 2020.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dec. 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001. Acesso em: 2 jul. 2020.
- FLOH, E. L. S.; SANTOS, A. L. W. dos; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. (org.). **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. v. 1, cap. 3, p. 88-111. 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/283710872>. Acesso em: 2 jul. 2020.

GEORGE, E. F., HALL, M. A., De KLERK, Geert-Jan (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht, NLD: Springer, 2008. v. 1, 508p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998.v. 1, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia I** – cultura de tecidos vegetal. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/6411245/apostila-biotecnologia-cultura-de-tecidos-vegetais>. Acesso em: 2 jul. 2020.

GUERRA, M. P. *et al.* **FIT5507 – Biotecnologia I**: apostila v2016.1. Santa Catarina: UFSC, 2016. 44p. Disponível em: <http://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>. Acesso em: 2 jul. 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. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999, v. 2, p.533-568.

LAMEIRA, O. A. **Propagação in vitro e in vivo dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenácea* L.)**. 1997. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/35506>. Acesso em: 2 jul. 2020.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID. L. P. B. (ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 4. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 4, 331p. *Ebook*. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/165158/1/E-book-Cultivo-in-vitro-de-plantas-4-Edicao.epub>. Acesso em: 2 jul. 2020.

LIMA, B. G. de. **Caatinga**: espécies lenhosas e herbáceas. Mossoró, RN: EdUFERSA, 2011. 316p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 415, Aug. 1980.

LOPES, C. A. *et al.* Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 11, n. 1, p. 21-25, jan./mar. 2016. Disponível em: http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=agraria_v11i1a5355&path%5B%5D=4885. Acesso em: 2 jul. 2020.

MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar**: potencial de uso em mudas submetidas à deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate. 2003. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/36238>. Acesso em: 2 jul. 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 2 jul. 2020.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 2 jul. 2020.

NEPOMUCENO, C. F. **Propagação e conservação in vitro de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012. 179 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012. Disponível em: <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/1036>. Acesso em: 2 jul. 2020.

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, mar./abr.2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000200015. Acesso

em: 2 jul. 2020.

NOGUEIRA, R. C. *et al.* Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n.1, p. 44-48, 2008. Disponível em: http://www.sbpmed.org.br/download/issn_08_1/artigo7_v10_n1_p44a48.pdf. Acesso em: 2 jul. 2020.

NOGUEIRA, W. de O. **Calogênese e estabelecimento de suspensões celulares de *Capsicum chinense* BRS Moema**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, 2015. Disponível em: <http://ri.unir.br/jspui/handle/123456789/2234>. Acesso em: 2 jul. 2020.

PELL, S. K. *et al.* Anacardiaceae. In: KUBITZKI, Klaus (ed.). **Flowering plants. Eudicots: sapindales, curcubitales, myrtales**. Nova York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p 7-50. (The families and genera of vascular plants, v. X). Disponível em: <https://www.springer.com/book/9783642143960>. Acesso em: 2 jul. 2020.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2008. 44p. (Documentos, 61). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2020.

REIS, A. *et al.* Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **Hoehnea**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 90-95, Jan./Mar. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2236-89062017000100090&script=sci_arttext. Acesso em: 2 jul. 2020.

ROCHA, J. F. da. **Indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**. 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, 2014. Disponível em: <http://ri.unir.br/jspui/handle/123456789/2058>. Acesso em: 2 jul. 2020.

SANTOS, C. G. *et al.* Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar. 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/491148/inducacao-e-analise-bioquimica-de-calos-em-segmentos-foliarese-nodais-de-coffee-canephora-l-cv-apoata>. Acesso em: 2 jul. 2020.

SANTOS, D. N. dos. *et al.* Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p.2268-2273, nov. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782010001100004&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 2 jul. 2020.

SANTOS, M. R. A. *et al.* Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n.1, p.142-148, Jan./Mar.2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000100142. Acesso em: 2 jul. 2020.

SANTOS, M. R. A. dos; SOUZA, C. A. de; PAZ, E. S. Growth pattern of friable calluses from leaves of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 3, p. 523-530, jul./set. 2017. Disponível em: <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/4463/1582:10.5935/1806-6690.20170061>. Acesso em: 2 jul. 2020.

SILVA, D. da *et al.* Indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*). **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 41, n. 4, p. 1044-1050, dez. 2018. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2018000400019. Acesso em: 2 jul. 2020.

SOUZA, F. P. de. **Micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae)**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015. Disponível em: <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/371>. Acesso

em: 2 jul. 2020.

STEIN, V. C. *et al.* Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 53, n. 2, p. 159-163, jul./dez. 2010. Disponível em: <http://periodicos.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/32>. Acesso em: 2 jul. 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p. Disponível em: https://grupos.moodle.ufsc.br/pluginfile.php/474835/mod_resource/content/0/Fisiologia%20e%20desenvolvimento%20vegetal%20-%20Zair%206%C2%Aaed.pdf. Acesso em: 2 jul. 2020.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998, v. 1, p. 71-86.

TREVIZAM, R. *et al.* Caracterização morfológica de calos *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, abr./jun. 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-77602011000200009&script=sci_abstract&lng=pt. Acesso em: 2 jul. 2020.

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. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000400004. Acesso em: 2 jul. 2020.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n 3, p. 508-514, 1954. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/57/3/508/48750/The-estimation-of-carbohydrates-in-plant-extracts?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 2 jul. 2020.