

Artigos

Caracterização histomorfológica e bioquímica de calos induzidos em *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis

Histomorphological and biochemical characterization of callus induction in *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis

Rosembrando Sosthenes Leite Carvalho Filho^I 

Tecla dos Santos Silva^I 

Yrexam Rodrigues de Souza Ribeiro^{II} 

Claudete Santa-Catarina^{II} , José Raniere Ferreira de Santana^I 

^IUniversidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil

^{II}Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil

RESUMO

Cenostigma pyramidale [Tul.] possui utilização madeireira, forrageira e medicinal e, em virtude da exploração de seus recursos naturais, pode acabar em via de extinção. Este trabalho objetivou induzir calos em *Cenostigma pyramidale* e identificar o potencial embriogênico por análises histomorfológica e bioquímica. Segmentos foliolares foram inoculados em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), combinadas com 6-benzilaminopurina (BAP; 0,0; 2,5 e 5,0 μM) e glutamina (0,0; 0,342 e 0,684 mM). A curva de crescimento foi realizada em intervalos de 7 dias, até o 77º dia, sendo coletadas amostras para análise histomorfológica e determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR), sacarose e açúcares solúveis totais (AST). É possível a indução de calos utilizando segmentos foliolares no tratamento com 5,0 μM de BAP, 7,0 μM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina. A curva de crescimento apresenta comportamento sigmoide com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio. Verificou-se a presença de células com características meristemáticas a partir do 7º dia de indução, sugerindo que os calos possuem potencial embriogênico. Porém, não se observou a diferenciação de embriões somáticos. Verificaram-se redução no conteúdo de AR e aumento de AST e sacarose durante a fase lag e início da fase exponencial, seguido de degradação na fase exponencial até a fase de declínio, mostrando o envolvimento destes carboidratos com o crescimento dos calos. Esses resultados são inéditos para a espécie e sugerem estudos futuros relacionados à maturação dos calos visando a diferenciação de embriões somáticos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; Curva de crescimento; Carboidratos



ABSTRACT

Cenostigma pyramidale [Tul.] has timber, forage and medicinal uses, and due to the exploitation of its natural resources, it may become endangered. This work aimed to induce callus in *Cenostigma pyramidale* and to identify the embryogenic potential by histomorphological and biochemical analysis. Leaf segments were inoculated in MS culture medium containing different concentrations (0.0; 2.5; 5.0 and 10.0 μM) of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), combined with 6-benzylaminopurine (BAP; 0.0; 2.5 and 5.0 μM) and glutamine (0.0; 0.342 and 0.684 mM). The growth curve was performed at 7-day intervals until day 77, and samples were collected for histomorphological analysis and determination of reducing sugars (RA), sucrose, and total soluble sugars (TSS) content. Callus induction is possible using leaf segments in treatment with 5.0 μM of BAP, 7.0 μM of 2,4-D and 0.684 mM of glutamine. The growth curve shows sigmoidal behavior with five distinct phases: lag, exponential, linear, deceleration and decline. It was verified the presence of cells with meristematic characteristics from the 7th day of induction, suggesting that the calli have embryogenic potential. However, differentiation of somatic embryos was not observed. There was a reduction in RA content and increase in AST and sucrose during the lag phase and beginning of the exponential phase, followed by degradation in the exponential phase until the decline phase, showing the involvement of these carbohydrates with callus growth. These results are unprecedented for the species and suggest future studies related to callus maturation aiming the differentiation of somatic embryos.

Keywords: *In vitro* cultivation; Growth curve; Carbohydrates

1 INTRODUÇÃO

Cenostigma pyramidale [Tul.] Gagnon & G. P. Lewis (Fabaceae), conhecida popularmente como catingueira, catinga-de-porco ou pau-de-rato, é uma espécie lenhosa, arbórea, endêmica do bioma Caatinga, cuja vegetação inclui uma diversidade de plantas de usos múltiplos. A espécie possui utilização na medicina popular, cujas flores, folhas e cascas são utilizadas no tratamento das infecções catarrais e diarreias; o uso de sua madeira, servindo como fonte de lenha, carvão, estacas, mourões e outros, utilidades que resultam na retirada da árvore, podendo impedir sua reprodução natural, ocasionando problemas com a propagação, o que pode aproximá-la do risco de extinção (MAIA, 2012).

Diante disso, faz-se necessária a elaboração de estratégias para multiplicação, conservação, manejo e exploração de seus recursos de forma sustentável. Nesse sentido, destaca-se a importância do uso de técnicas biotecnológicas, como a



cultura de tecidos de plantas, para a propagação vegetativa em larga escala e em qualquer época do ano (COPELAND, 2017). Dentre as vias de propagação *in vitro*, destaca-se a embriogênese somática, a qual pode ser considerada vantajosa em relação à regeneração por organogênese, devido à possibilidade de elevadas taxas de multiplicação e o desenvolvimento de plantas com maior integridade genética (GRANDO *et al.*, 2013).

Na embriogênese somática, células somáticas se desenvolvem em plantas sem que haja a fusão de gametas (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014). Esse processo pode ocorrer por via direta (sem fase de calos) ou indireta, na qual ocorre primeiro a calogênese e, em seguida, o início da formação de embriões somáticos a partir dos calos (ALVES *et al.*, 2018). Esses embriões terão a presença dos meristemas radiculares e apicais simultaneamente, resultando numa planta completa (CAMPOS *et al.*, 2009). Durante a indução da embriogênese somática, estudos da identificação das fases da curva de crescimento dos calos são importantes para identificar o momento adequado da transferência para o novo meio de cultura, ou mesmo a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

O uso de reguladores de crescimento vegetal é fundamental para que ocorra a desdiferenciação dos tecidos durante a indução de calos e a diferenciação para formação de embriões somáticos (VILELA *et al.*, 2019). A auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a mais amplamente utilizada pelo potencial embriogênico para obtenção de embriões somáticos em plantas (SHARMA; BRYAN; MILLAM, 2007). Dentre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) se destaca na promoção da divisão e diferenciação celular, estimulando a proliferação celular formando massas celulares quando em concentrações adequadas (GEORGE *et al.*, 2008). Além dos reguladores citados, a glutamina, uma forma de nitrogênio orgânico prontamente assimilável, pode estar relacionada à indução do processo embriogênico, considerando que os aminoácidos desempenham funções importantes em todas as etapas desse processo (BARTOS *et al.*, 2018).



Durante a indução e o desenvolvimento *in vitro* da calogênese, estudos associados a alterações histomorfológicas, visando a caracterização e identificação de células com estruturas meristemáticas, são importantes para mostrar se o calo apresenta competência para a diferenciação de embriões somáticos (MACIEL *et al.*, 2010). Ademais, a caracterização bioquímica dos calos pode contribuir na elucidação de processos desencadeados pela morfogênese dos tecidos (RODRIGUES *et al.*, 2020), tal como a quantificação do conteúdo de carboidratos.

Desse modo, objetivou-se 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 histomorfológicos, bem como compreender a dinâmica do conteúdo de carboidratos ao longo do período de cultivo *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 Material vegetal

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. Para os experimentos, foram utilizados segmentos foliolares obtidos de plântulas após 45 dias de germinação *in vitro*.



2.2 Germinação *in vitro*

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, 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) (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 87,64 mM de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ 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 sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 14 horas e radiação fotossintética ativa de 60 $\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. As plântulas obtidas após 45 dias da germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explante para os experimentos.

2.3 Efeito do 2,4-D, BAP e da glutamina na indução da calogênese a partir de explantes foliolares

Segmentos foliolares ($\pm 0,5\text{ cm}^2$), obtidos a partir dos foliólulos de plântulas germinadas *in vitro* 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 (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 μM) de 2,4-D combinadas com concentrações (0,0; 2,5 e 5,0 μM) de BAP e glutamina (0,0; 0,342 e 0,684 mM). O meio de cultura foi acrescido com 87,64 mM de sacarose e solidificado com 7 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 x 3 x 3 (concentrações de 2,4-D x concentrações de BAP x concentrações



de glutamina), totalizando 36 tratamentos. Cada tratamento foi 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 ± 3 °C, na ausência de luz. Após 45 dias de cultivo, foram avaliadas a porcentagem dos explantes responsivos para formação de calos (ERFC) e a massa fresca dos explantes com e sem calos (MFEC).

2.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos

Para o estabelecimento da curva de crescimento, foi utilizado o tratamento contendo meio de cultura MS suplementado com $5,0 \mu\text{M}$ de BAP, $7,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,684 \text{ mM}$ de glutamina (melhor tratamento obtido no item anterior), acrescido com $87,64 \text{ mM}$ de sacarose e solidificado com 7 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 durante a indução de 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).

Amostras obtidas em cada período de incubação (em intervalos de 7 dias), contados a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) foram coletadas para análises histomorfológicas e bioquímicas.

2.5 Análises do conteúdo de carboidrato

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), as amostras (100 mg de massa fresca), em triplicata biológica para cada tratamento, foram maceradas 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 à centrifugação por 15 minutos a 25 °C e 3000 rpm. O sobrenadante foi obtido e armazenado a \pm -20 °C até a realização da 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.

2.6 Análises histomorfológicas dos calos

Foram realizadas avaliações histomorfológicas nas amostras de calos obtidos a cada período da curva de crescimento, visando caracterizar a presença de células em divisão com características embriogênicas e/ou embriões somáticos. Para tanto, as amostras foram fixadas em FAA 70% durante 72 horas e, após a fixação, foram progressivamente desidratadas em série etanólica (70, 90 e 100%), por duas vezes de aproximadamente 1 hora em cada tempo de desidratação.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com historesina e etanol 100% (1:1) durante 12 horas e, subsequentemente, com historesina pura durante 24 horas, em seguida foram emblocadas em historesina (Leica Microsystems®). Secções longitudinais (com aproximadamente 7 μ 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).



2.7 Análise Estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do *Software R* (v.3.5.3) com auxílio do aplicativo de apoio RStudio. Esses foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de variâncias, Shapiro-Wilk e Bartlett a 5% de probabilidade, respectivamente. Em seguida, foi realizada a análise de variância. As médias originais foram submetidas à regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

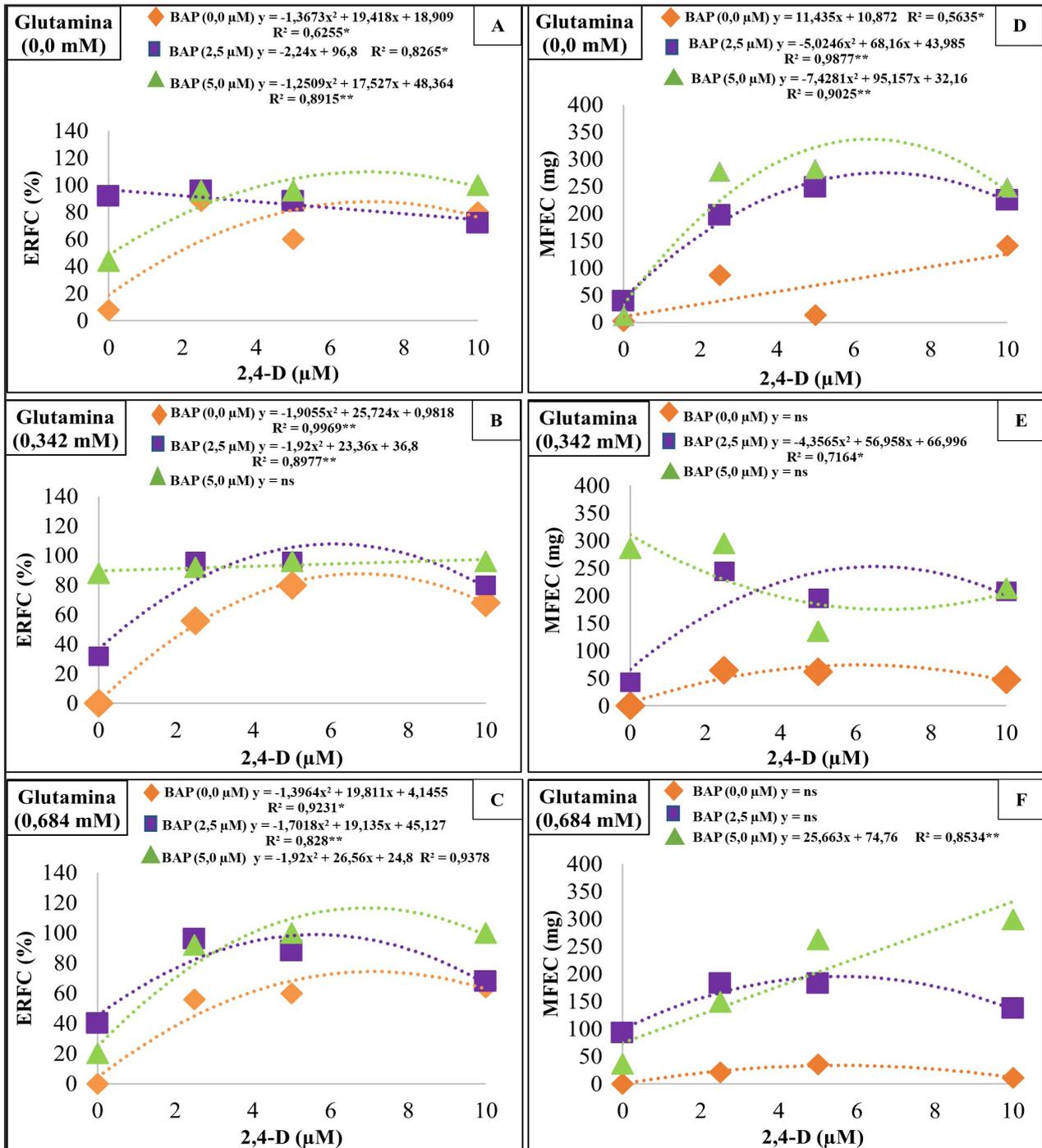
A análise de variância demonstrou efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) do fatorial triplo (2,4-D x BAP x Glutamina) para as duas variáveis avaliadas. Ao analisar a porcentagem de explantes responsivos para a formação de calos (ERFC), verificou-se que na ausência de glutamina foi constatado comportamento quadrático ascendente (Figura 1A) tanto em meio isento ($p \leq 0,05$) de BAP, quanto em maior concentração ($p \leq 0,01$). 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 μM de 2,4-D. Já, na maior concentração de BAP testada (5,0 μM), o ponto de máxima estimado (109,76%) é alcançado com a utilização de 7,0 μM de 2,4-D (Figura 1A).

Esses resultados mostram a importância da interação entre os reguladores de crescimento para ERFC em *C. pyramidale*, já que 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 auxinas e citocininas, possuindo funções essenciais em processos celulares, como divisão, expansão e diferenciação, eventos considerados vitais ao crescimento e desenvolvimento das plantas (NORDSTRÖM *et al.*, 2004).

Dessa forma, os hormônios são 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 (SKALICKÝ *et al.*, 2018). Assim, é provável que essas células responsivas aos reguladores de crescimento para a indução de calos sejam caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e então iniciam a resposta celular, teoria que pode fundamentar a resposta obtida neste estudo quanto à capacidade responsiva aos estímulos da indução à calogênese.



Figura 1 – Percentagem de explantes responsivos para formação de calos (ERFC) e massa fresca dos explantes com calos (MFEC) obtidos a partir de segmentos foliolares de *Cenostigma pyramidale* aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e Glutamina



Fonte: Autores (2021)

Em que: (ns, **, * - não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente).



A interação entre auxinas e citocninas 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). Os resultados obtidos mostram que, em *C. pyramidale*, a interação foi do tipo sinérgica, evidenciada pelo efeito positivo da combinação dos reguladores de crescimento vegetais testados

Na maioria das plantas, o equilíbrio entre as concentrações de auxina/citocinina aplicados ao meio de cultura tende a favorecer, em geral, a formação de calos. Reis *et al.* (2017) combinaram o uso da auxina 2,4-D com a citocinina CIN (cinetina) em explantes foliares e internodais de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e observaram a taxa máxima (100%) de formação de calos em explantes foliares durante 30 dias no tratamento, contendo 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 de *Piper permucronatum* Yunck. na combinação de 4,52 μM de 2,4-D e 4,44 μM 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 (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).

Em meio de cultura contendo 0,34 mM de glutamina, a variável porcentagem ERFC apresentou comportamento quadrático ascendente ($p \leq 0,01$) na ausência e na presença 2,5 μM de BAP, demonstrando pontos de máxima 87,80% e 107,85% nas concentrações estimadas de 6,7 e 6,1 μM de 2,4-D, respectivamente (Figura 1B). Na maior concentração de BAP testada (5,0 μM), não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo. Na maior concentração de glutamina testada (Figura 1C), 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 μM de BAP), 95,66% (2,5 μM de BAP) e 116,65% (5,0 μM de BAP), os quais foram obtidos utilizando, respectivamente, as concentrações de 7,1 μM , 5,6 μM e 6,9 μM da auxina 2,4-D.

Além da adição da citocinina combinada com a auxina, o uso da glutamina também pode ter influenciado nos resultados, assim como relatado por Silva *et al.* (2020) em culturas calogênicas de *Myracrodruon urundeuva*. No entanto, diferentemente do observado nesse estudo, os autores Silva *et al.* (2020) revelaram a presença de formações globulares, indicando o potencial embriogênico dos calos em *M. urundeuva*. Utilizar a glutamina no meio de cultura, embora seja um tema pouco abordado na literatura, possui relação com a indução de embriões somáticos. Lino *et al.* (2008) avaliaram o efeito da glutamina na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências masculinas em bananeiras triploides (*Musa* sp). Esses autores verificaram na bananeira 'Maçã' a formação de embriões somáticos de coloração esbranquiçada nas concentrações de 342,13; 684,27 e 1026,40 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 MFEC, em meio isento de glutamina, verificou-se comportamento quadrático ascendente ($p \leq 0,01$) na presença da citocinina BAP (Figura 1D). A equação polinomial indica que os pontos de máxima estimados de 275,20 mg (2,5 μM de BAP) e 336,90 mg (5,0 μM de BAP) são atingidos com os valores calculados de 6,78 e 6,40 μM de 2,4-D, respectivamente. Na ausência de BAP, a variável apresenta comportamento linear crescente ($p \leq 0,05$) (Figura 1D). A massa fresca dos calos em meio contendo 0,34 mM de glutamina demonstrou comportamento quadrático ascendente ($p \leq 0,05$) na presença de 2,5 μM de BAP. Estima-se que o ponto de máxima de 253,17 mg seja obtido com o uso de 6,54 μM da auxina 2,4-D (Figura 1E).



Em *Cenostigma pyramidale*, a combinação de auxina, citocinina e glutamina foi importante para incremento da MFEC dos calos. 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. Entretanto, além da utilização de reguladores de crescimento, existem outros fatores que influenciam no processo de calogênese e acúmulo de massa fresca, dentre eles o genótipo, tipo de explante e o ambiente de cultivo. Copeland (2017), por exemplo, testando diferentes concentrações de 2,4-D (4,5; 9,0; 13,5; 18,0; 22,5 μM) 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 (CAMPANONI; NICK, 2005).

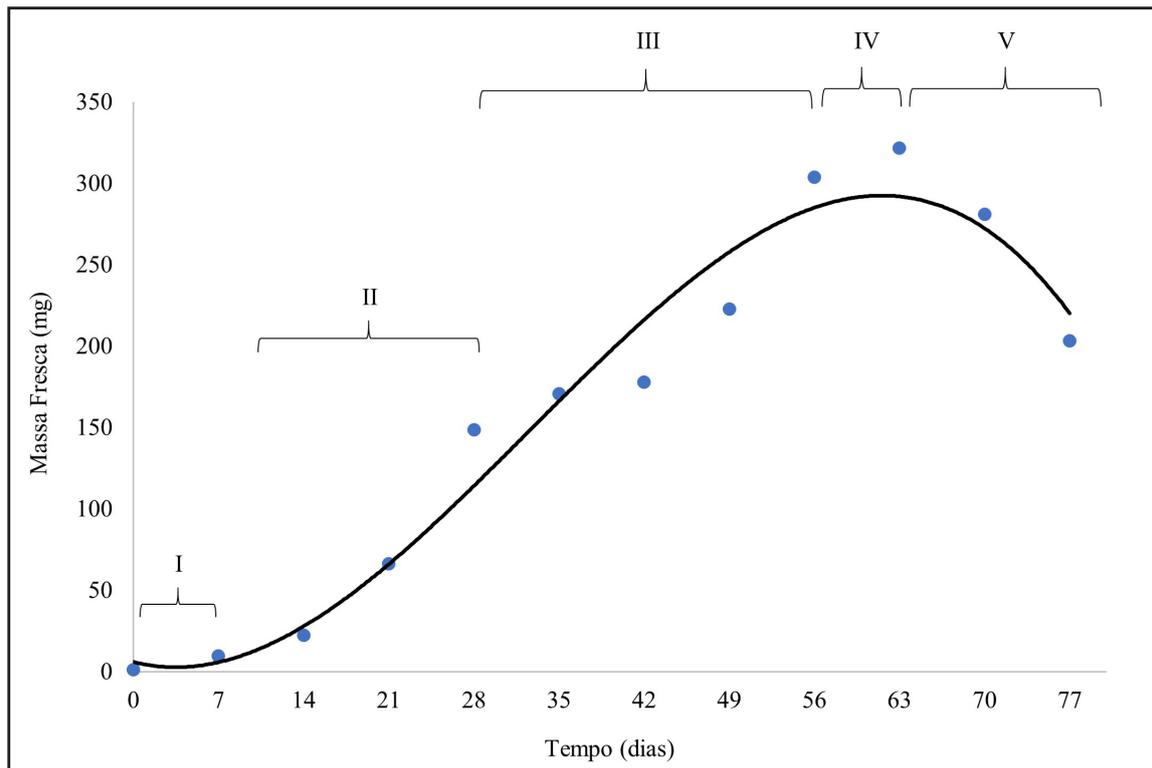
Silva *et al.* (2020) avaliando o efeito da auxina 2,4-D, da citocinina CIN (cinetina) e da glutamina na calogênese de *Myracrodruon urundeuva* verificaram que, ao adicionar 2,5 μM de CIN, 2,5 μM de 2,4-D associados com 0,68 μM de glutamina no meio de cultura, foi alcançada a maior média (166,73 mg) de massa fresca a partir em explantes foliares da espécie. O aumento das concentrações (5,0 μM de CIN, 5,0 μM de 2,4-D e 1,37 μM) no meio de cultura foi suficiente para redução do conteúdo de massa fresca, resultando em 144,15 mg de biomassa.

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 μM de BAP, em que a variável demonstra comportamento linear crescente ($p \leq 0,01$) (Figura 1F).

Analisando a curva de crescimento dos calos, verificou-se padrão sigmoidal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio (Figura 2).



Figura 2 – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* inoculados em meio de cultura MS suplementado com 5,0 μ M de BAP, 7,0 μ 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



Fonte: Autores (2021)

A primeira fase da curva de crescimento, conhecida como fase lag, ocorreu até o 7º dia de cultivo (Figura 2) e representou um percentual de 88,99% de crescimento, o que pode ser considerado elevado quando comparado ao estudo de calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. no qual os autores verificaram que, neste mesmo intervalo de tempo, o crescimento foi de 33,86% (SILVA *et al.*, 2020). Essa 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 o comportamento de diferentes espécies quanto ao tempo em que a mesma fase



ocorre, como relatado 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 annum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño ocorreu 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 exponencial (fase II) ocorreu entre o 7º e o 28º dia de cultivo, cuja taxa de crescimento foi de 93,62% (Figura 2). Neste intervalo verificou-se leve aumento na taxa de crescimento quando comparado à fase anterior. O início desta fase é marcado pelo aumento das divisões celulares, comportamento que, diferentemente da *Cenostigma pyramidale*, em explantes foliares de *Piper permucronatum*, expressou-se do 21º ao 49º dia de cultivo (SANTOS *et al.*, 2016). Entretanto, em calos de aroeira-do-sertão, partindo de explantes foliares e considerando a sua característica lenhosa, a fase exponencial ocorreu 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 2). 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 período foi observado entre 14 e 28 dias (LOPES *et al.*, 2016); já, em *Capsicum annum* 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).

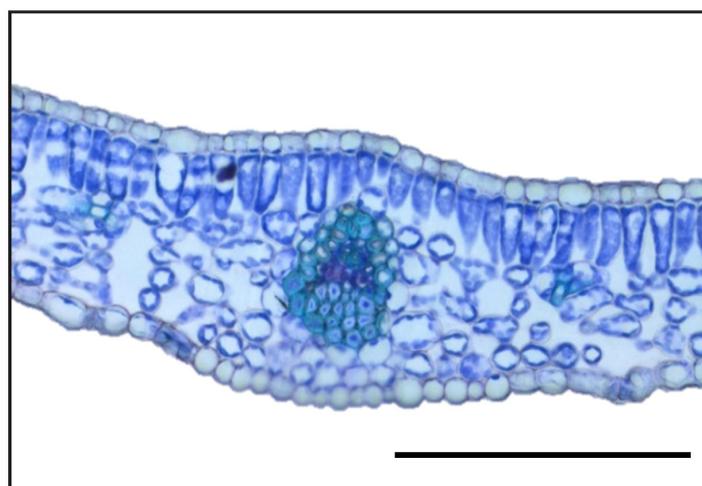
A interpretação da curva de crescimento dos calos de catingueira revelou que do 56º ao 63º dia de cultivo iniciou-se a fase de desaceleração (Figura 2) com taxa de crescimento que chegou a 5,57%, período extremamente relevante ao estudo, que se caracteriza pela redução das divisões celulares, maior produção de metabólitos secundários e, principalmente, marca o momento que deve ser iniciado o processo de repicagem dos calos (PAN *et al.*, 2020). 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 (SANTOS *et al.*, 2016).



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 2), com percentual de crescimento de 58,44%, valor que está intimamente ligado à definição desta fase. Segundo Santos *et al.* (2010), esta fase é o período em que ocorre perda de peso devido à morte celular. Oposto ao ocorrido neste estudo com a catingueira, Pan *et al.* (2020) estudando o padrão de crescimento de calos em *Bletilla striata* Rchb. f., verificaram que, logo após 39 dias de cultivo *in vitro*, os calos apresentavam um escurecimento óbvio, indicando que o crescimento entrou na fase de recessão, ou seja, foi caracterizada a fase de declínio.

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 3).

Figura 3 – Detalhes anatômicos do corte transversal do explante foliar de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P.Lewis antes da inoculação para indução de calos



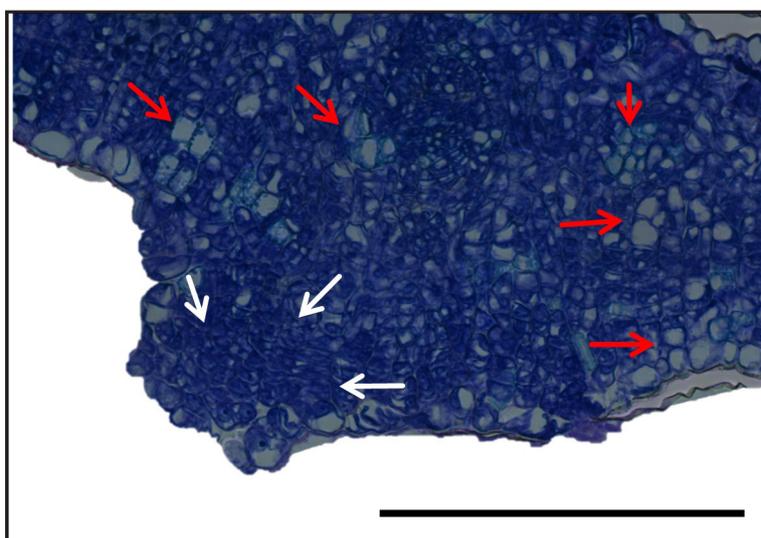
Fonte: Autores (2021)

Em que: Barra: 100 μ M.



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 a partir do tecido foliar inicial, 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 4). Na Figura 4, pode-se verificar a formação de calo com a presença de células com baixo potencial meristemático, por apresentarem-se altamente vacuolizadas (setas vermelhas), e a existência de células pequenas, isodiamétricas, pouco vacuolizadas, núcleo evidente e citoplasma denso (setas brancas), o que caracteriza células meristemáticas, podendo indicar que, aos 7 dias, o calo induzido possui características de culturas embriogênicas.

Figura 4 - Aspectos histológicos, em corte transversal, dos calos ao 7º dia de crescimento que corresponde ao início da fase exponencial, oriundos de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G. P. Lewis 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



Fonte: Autores (2021)

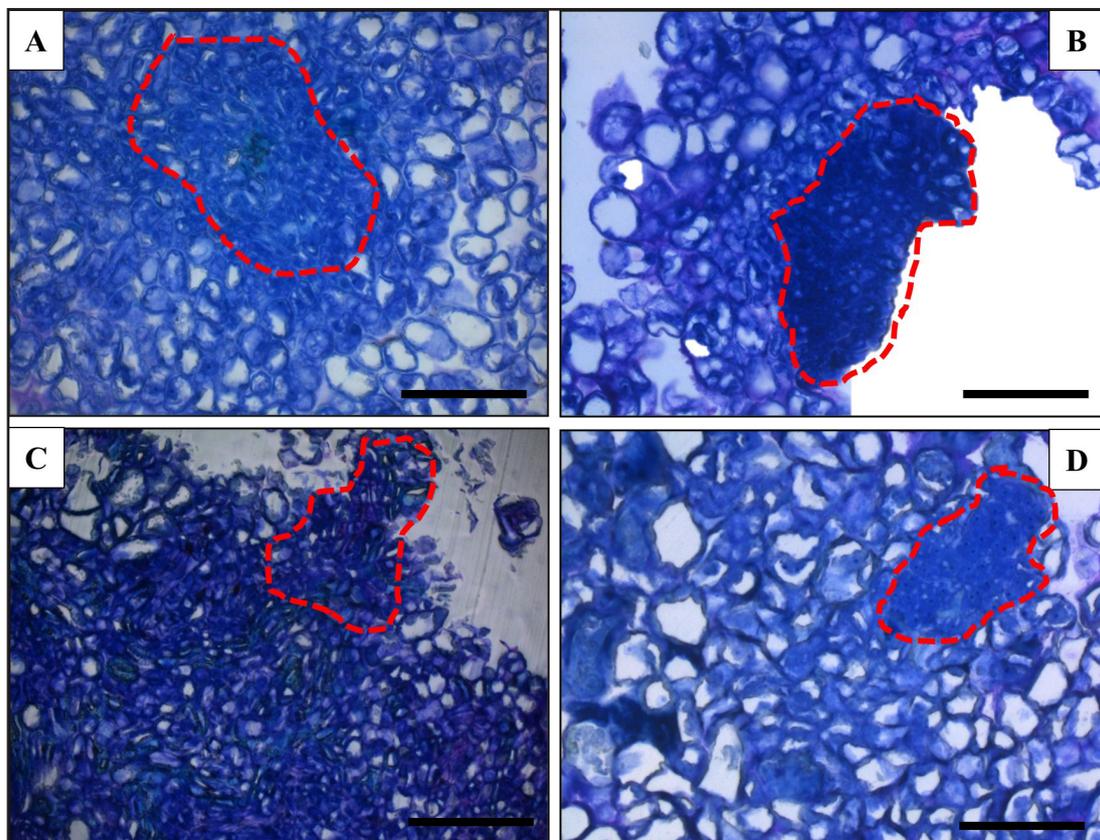
Em que: Objetiva de 20x; Barra: 100 µM.

No 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



que os calos continuaram apresentando células com características meristemáticas, i.e., isodiamétricas, aderidas, pouco vacuolizadas, com citoplasma denso e núcleos proeminentes (regiões da figura 5 destacadas em vermelho), em meio a grupos de células altamente vacuolizadas, com características não meristemáticas. Essas 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 5). Esse tipo de célula, a depender do estímulo, pode se tornar competente para se dividir e diferenciar em embriões somáticos.

Figura 5 – Aspectos histológicos de calos ao 21° (A), 28° (B), 35° (C) e 42° (D) dia de incubação, oriundos de explantes foliolares de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G. P. Lewis 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



Fonte: Autores (2021)

Em que: Barras: 100 µM.



A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfogênético 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.*, 2010). 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 2,4-D e BAP. Similarmente, em estudos com Sisal (*Agave sisalana* Perrine), também foi relatado que o uso do 2,4-D e BAP foi preponderante na indução de calos com potencial embriogênico (CARNEIRO *et al.*, 2014).

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 apresenta células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, os quais originam estruturas globulares. Enquanto, os calos não-embriogênicos possuem células bastante desorganizadas, alongadas e altamente vacuoladas.

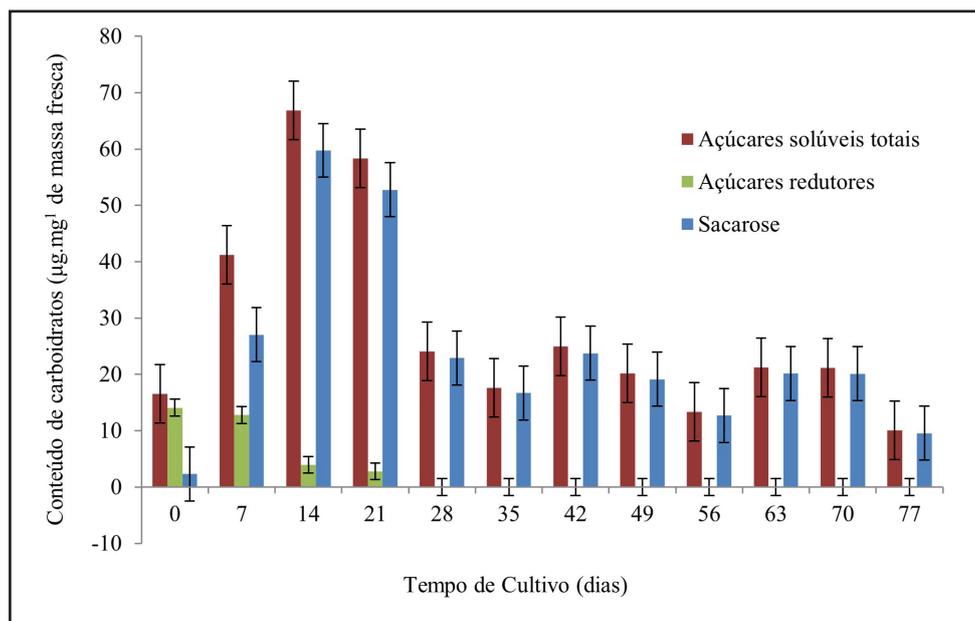
Assim, neste estudo com a catingueira, foi possível identificar evidências morfohistológicas que sugerem que os calos possuem potencial embriogênico, juntamente com células de calos sem nenhum potencial para desenvolvimento de embriões somáticos. No entanto, não foi possível identificar a presença de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, sugerindo que esses calos devem passar por um teste de maturação quando encontram-se na fase exponencial



(7° - 28° dia), para ocorrer o estímulo para a diferenciação dos embriões somáticos. A maturação trata-se de uma etapa crucial para o processo de embriogênese somática, em que normalmente utilizam-se compostos químicos, como o ácido abscísico (ABA) (RAI *et al.*, 2011) usado, por exemplo, em *Picea* spp. (HAZUBSKA-PRZYBYL *et al.*, 2016), agentes osmóticos como PEG ou maltose (HERINGER *et al.*, 2013) ou ainda carvão ativado, como em cana de açúcar (SILVEIRA *et al.*, 2013).

A análise bioquímica dos calos após 77 dias de cultivo revelou a presença de AST, sacarose e AR, sendo que, este último, após o 21° 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 14° dia de cultivo, com queda a partir do 21° dia (Figura 6).

Figura 6 – Conteúdo de carboidratos em calos de *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G. P. Lewis obtidos 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



Fonte: Autores (2021)

Em que: (média ± desvio padrão, n= 3).



Verificou-se nos explantes no tempo inicial, ou seja, no dia “zero” (antes da inoculação) até o 21º dia de cultivo, uma redução nos teores de AR e um aumento nos teores de AST e sacarose (Figura 6). Esse período corresponde a fase lag e início da fase exponencial da curva de crescimento dos calos (Figura 6). O início da fase exponencial corresponde a uma fase de alta divisão celular resultando no aumento do crescimento dos calos, e, por consequência, é um período de alta demanda energética, sendo marcada neste estudo pela redução do conteúdo de AR, sugerindo o seu uso nesta fase. Além disso, é possível que os AR tenham sido convertidos pelas células em AST e sacarose. Após o 21º dia, verificou-se diminuição considerável dos teores de AST e sacarose (Figura 6).

Esse resultado é semelhante ao relatado por Santos *et al.* (2008) que, ao analisarem o conteúdo de AR de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* ‘Apoatã’, verificaram que o teor máximo desses carboidratos ocorreu no dia da inoculação dos explantes (0 dia de cultivo, início da fase lag), a partir do qual apresentou redução, atingindo um teor mínimo no 84º dia, que foi o último de cultivo. O conteúdo de carboidratos presente nos explantes foliolares, que são utilizados durante a inoculação, originou-se da planta doadora, que em razão do cultivo heterotrófico absorveu a sacarose disponível no meio de cultura (SILVA *et al.*, 2020).

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. 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 (SMITH; ZEEMAN; SMITH, 2005). Os carboidratos, além de serem fontes de carbono, afetam o crescimento dos calos, particularmente a divisão e expansão



celular, e podem também estar envolvidos com redes de sinalização de hormônios vegetais, na modulação de processos críticos, como o estabelecimento de embriões (EVELAND; JACKSON, 2012).

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). Semelhante a isso, em calos de *Byrsonima intermedia*, os teores de AST apresentaram tendência geral de declínio, embora tenham expressado maior conteúdo nos explantes antes da inoculação (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

A partir do 35º dia, foi observada uma redução no conteúdo de AST e de sacarose (Figura 6). Esse comportamento 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 nesta espécie. Os carboidratos fornecem esqueletos de carbono e energia para a biossíntese de compostos orgânicos envolvidos no metabolismo celular (SANTOS *et al.*, 2010).

Nesse sentido, os resultados obtidos no período de transição da fase exponencial à fase linear ocorreram devido à necessidade de carboidratos como fonte de energia para o crescimento dos calos. Santos *et al.* (2010) 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, sendo resultados contrários ao observado para *C. pyramidale*.

A partir do 28º dia até o final de cultivo em diante, o comportamento de acúmulo de carboidratos oscilou com tendência a declínio (Figura 6). Esse resultado pode ser devido, provavelmente, à disponibilidade de sacarose no meio de cultura e 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 (Figura 2). Diferentemente ao observado neste trabalho, calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) durante 120 dias de cultivo apresentaram um pico de AST aos 70 dias, e os autores 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 (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

4 CONCLUSÕES

O tratamento com 5,0 de μM BAP, 7,0 μM de 2,4-D e 0,684 mM de glutamina possibilitou a indução de calos a partir de explantes foliolares. A curva de crescimento dos calos apresenta forma sigmoideal com cinco fases distintas (lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio) durante 77 dias de cultivo. Verificou-se a presença de células com características similares àquelas consideradas meristemáticas nos calos a partir de 7 dias de indução, sugerindo um potencial embriogênico dos calos. Porém, não foi constatado desenvolvimento de embriões somáticos, sendo necessários estudos futuros associados com a maturação dos calos para sua diferenciação. O conteúdo de AR, sacarose e AST variou em função das fases de crescimento dos calos durante a indução, com redução de AR e aumento de AST e sacarose até o 21º dia de incubação, sendo que a partir deste dia não houve AR e o conteúdo de sacarose e AST reduziram até o 77º dia de incubação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, I. S. *et al.* 2- Isopentenyladenine in the induction of direct somatic embryogenesis capacity of *coffea arabica* L. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 11, p. 1-5, 2018.
- BARTOS, P.M.C. *et al.* Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L.. 3 **Biotech** 8, 209, 2018.
- CAMPANONI, P.; NICK, P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. **Plant Physiology**, v. 137, p. 939-948, 2005.



CAMPOS, J. M. S. *et al.* Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 38–44, 2009.

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.

COPELAND, K. K. P. G. *et al.* *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 525–528, 2017.

EVELAND, A. L.; JACKSON, D. P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3367–3377, 2011.

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.

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**. v. 1. 3.ed., Springer, Dordrecht, p. 2–28, 2008.

GRANDO, M. F. *et al.* Pendão imaturo como explante alternativo na embriogênese somática e regeneração de plantas em genótipos sul brasileiros de milho. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 39–47, 2013.

HAZUBSKA-PRZYBYL, T. *et al.* Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 59, p.14, 2016.

HERINGER, A. S. *et al.* Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 2, p.116–124, 2013.

KHAN, T *et al.* Production of biomass and useful compounds through elicitation in adventitious root cultures of *Fagonia indica*. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 451–457, 2018.

LINO, L. S. M. *et al.* Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1325-1330, 2008.

LOPES, C. A. *et al.* Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 21–25, 2016.

LLOYD, G; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Horticultural Science**, Alexandria. v. 15, p. 415. 1980.

MACIEL, S. A. *et al.* Caracterização morfoanatômica de calos embriogênicos originados de embriões zigóticos imaturos de pupunheira durante a embriogênese somática. **Acta Scientiarum - Agronomy**, 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.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

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

NOGUEIRA, R. C. *et al.* Calli induction from leaf explants of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366–370, 2007.

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**, v. 101, p. 8039-8044, 2004.

PAN, Y. *et al.* Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. **PLoS ONE**, v.15, n.2, 2020.

RAI, M. K. *et al.* The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 2, p. 179-190, 2011.

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.

RODRIGUES, F. R. *et al.* *In vitro* callus induction and development of *Vernonia condensata* baker with embryogenic potential. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 44, e026719, 2020.

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. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2268-2273, 2010.

SANTOS, M. R. A. *et al.* Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & c. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 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 annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. **Revista Ciencia Agronomica**, 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, T. S. *et al.* Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020.



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**, v. 65, n. 5, p. 1343–1360, 2014.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. Starch degradation. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, p. 73-98. 2005.

STEIN, V. C. *et al.* Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159–163, 2010.

VILELA, M. S. P. *et al.* Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Revista Arvore**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2019.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

Contribuição de Autoria

1 Rosebrando Sosthenes Leite Carvalho Filho

Me., Doutorando

<https://orcid.org/0000-0001-5465-6804> • eagrnomocarvalho@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Investigação, Metodologia, Visualização de dados (gráficos), Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição

2 Tecla dos Santos Silva

Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0003-4188-3439> • silva.stecla@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Metodologia, Visualização de dados (gráficos), Escrita – revisão e edição

3 Yrexam Rodrigues de Souza Ribeiro

Dra.

<https://orcid.org/0000-0003-1900-969X> • yrexam@hotmail.com

Contribuição: Metodologia, Escrita – revisão e edição



4 Claudete Santa-Catarina

Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0002-1669-660X> • claudete@uenf.br

Contribuição: Conceituação, Metodologia, Validação, Visualização de dados (gráficos), Escrita – revisão e edição

5 José Raniere Ferreira de Santana

Dr., Professor

<https://orcid.org/0000-0003-0186-6888> • jose.raniere@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Supervisão, Validação, Recursos, Visualização de dados (gráficos), Escrita – revisão e edição

Como citar este artigo

Carvalho Filho, R. S. L.; Silva, T. S.; Ribeiro, Y. R. S.; Santa-Catarina, C.; Santana, J. R. F. Caracterização histomorfológica e bioquímica de calos induzidos em *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & G.P. Lewis. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 33, n. 1, e66334, p. 1-26, 2023. DOI 10.5902/1980509866334. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509866334>.