

INDUÇÃO *in vitro* DE CALOS EM OVÁRIOS FLORAIS DE *Paubrasilia echinata*

Autores: Mayla Bessa Scotá¹, Thalya Campelo Vitor¹, Aline dos Santos Bergamin¹, Kátia Aguiar de Souza Monteiro¹, Claudete Santa-Catarina², Milene Miranda Praça Fontes¹, Elias Terra Werner¹.

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, mayla_scotta@hotmail.com, thalyavitor26@gmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, katiamonteiro0603@gmail.com, mlenenmiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

² Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil, claudete@uenf.br.

Resumo

O pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), espécie ameaçada da Mata Atlântica, enfrenta obstáculos à conservação principalmente devido à recalcitrância de suas sementes. A cultura de tecidos vegetais (CTV) desponta como alternativa viável para sua propagação. Este estudo investigou a desinfestação de ovários não fecundados e a indução de calos *in vitro* com diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os explantes foram cultivados em meio MS com 2,4-D (5.0, 10.0 e 50.0 µM), com ou sem carvão ativado. A desinfestação foi eficaz, com contaminação inferior a 4%. Os tratamentos com Murashige e Skoog (MS) e adição de 5.0, 10.0 ou 50.0 µM de 2,4-D apresentaram porcentagem de calogênese de 90.0, 87.5 e 90.0%, respectivamente, destacando o papel do 2,4-D e o efeito inibitório do carvão ativado. Os resultados contribuem para o desenvolvimento de protocolos eficientes de conservação da espécie.

Palavras-chave: cultura de tecidos . mata atlântica . pau-brasil . regeneração

Área do Conhecimento: Ciências biológicas. Fisiologia.

Introdução

O pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), é uma espécie nativa e emblemática da Mata Atlântica, no entanto, encontra-se ameaçada de extinção devido à perda de habitat e exploração excessiva (CNNFlora, 2012). A espécie *P. echinata* possui importância ecológica e cultural significativa. No entanto, sua conservação enfrenta desafios notáveis, especialmente relacionados à propagação natural, uma vez que suas sementes são recalcitrantes (Lisboa *et al.*, 2004), ou seja, não suportam a desidratação que ocorre naturalmente após dispersão no ambiente, e, têm baixa viabilidade quando armazenadas por longos períodos. Esta característica dificulta a regeneração natural da espécie e a manutenção de sua diversidade genética (Barbedo *et al.*, 2002).

Estratégias biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais (CTV) surge como uma abordagem promissora para a conservação e propagação do pau-brasil, oferecendo soluções para superar as barreiras impostas pela recalcitrância das sementes (Rout *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2020). Dentro dessa abordagem, é possível trabalhar com diferentes tipos de explantes, como folhas, ovários florais, embriões zigóticos e sementes imaturas, ampliando as possibilidades de regeneração *in vitro*. Todavia, a principal dificuldade inicial está na desinfestação eficiente e no estabelecimento de explantes saudáveis e livres de patógenos no ambiente de cultivo, especialmente devido à alta taxa de contaminação por microrganismos endógenos presentes nos materiais coletados diretamente do campo, e, principalmente de espécies lenhosas (Campos; Cota, 2015).

Uma vez superado esse obstáculo inicial, diferentes vias podem ser exploradas para alcançar a regeneração de novas plântulas. Entre elas, destaca-se a indução de tecido caloso como etapa intermediária, que pode seguir para embriogênese somática ou organogênese indireta, dependendo das condições de cultivo e dos reguladores de crescimento vegetal (RCVs) utilizados. O desenvolvimento de protocolos específicos de CTV é essencial para cada espécie, pois garante a adaptação das técnicas às necessidades particulares dos explantes e ao ambiente de cultivo. Estes protocolos incluem a definição de condições ideais de desinfestação (Ferreira *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2019), meios de cultura e RCVs adequados para induzir a calogênese.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

O uso de RCVs é essencial para o sucesso dessas etapas, pois eles promovem a resposta desejada dos explantes às condições *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1998). As auxinas, em especial, são indispensáveis para a desdiferenciação celular e a indução da calogênese. Comumente utilizadas em protocolos de CTV, incluem o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA), Dicamba (DIC), e, assim como o 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e o Picloram (Rocha *et al.*, 2024).

O objetivo do estudo foi avaliar a indução de calos em ovários de *P. echinata*, obtidos de botões florais em estágio pré-antese, cultivados *in vitro* em meio contendo diferentes concentrações de 2,4-D, com ou sem a adição de carvão ativado, visando não apenas o estabelecimento de calos como etapa inicial da morfogênese *in vitro*, mas também a análise do efeito adsorvente do carvão ativado sobre a resposta calogênica dos explantes.

Metodologia

Inflorescência (Figura 1A) de *P. echinata* foram coletadas no início da antese, quando apenas os primeiros botões florais estavam se abrindo. Os botões florais ainda fechados foram cuidadosamente selecionados e utilizados como fonte de explantes para os experimentos de calogênese *in vitro*. As estruturas foram transportadas ao laboratório em sacos plásticos umedecidos, sob temperatura ambiente, e processadas no mesmo dia da coleta. Botões florais (Figura 1B) em estágio pré-antese, foram retirados das inflorescências e submetidos a um processo de desinfestação em fluxo laminar. Inicialmente, estes botões florais foram lavados com água e detergente neutro, seguidos de enxágues em água corrente para remoção dos resíduos do detergente. Em seguida, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, e posteriormente em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo (Qboa®) por 20 minutos, com agitação constante durante todo o processo para garantir a eficácia da desinfestação. Após esse tratamento, foram enxaguados 5 vezes com água de osmose autoclavada para remoção dos resíduos do desinfetante. Após os enxágues, os botões florais foram cuidadosamente abertos (Figura 1C) para a retirada dos ovários (Figura 1D), e estes utilizados como explantes.

Os ovários imaturos foram transferidos para placas de Petri contendo 10.0 mL de meio de cultura. Os meios testados foram suplementados com diferentes componentes, e, concentrações do RCV 2,4-D conforme descrito na Tabela 1. Após inoculação, as placas foram incubadas a temperatura de 25±2 °C sob escuro constante.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados para a inoculação de ovários de *P. echinata* retirados de botões florais em estágio pré-antese.

Sais MS g L ⁻¹	Sacarose g L ⁻¹	Phytigel g L ⁻¹	Caseína g L ⁻¹	Cisteína g L ⁻¹	Extrato de Malte g L ⁻¹	Carvão g L ⁻¹	2,4-D µM
4.4	30.0	2.8	—	—	—	—	0
4.4	30.0	2.8	—	—	—	—	5.0
4.4	30.0	2.8	—	—	—	—	10.0
4.4	30.0	2.8	—	—	—	—	50.0
4.4	30.0	2.8	0.2	0.04	0.8	2.0	0
4.4	30.0	2.8	0.2	0.04	0.8	2.0	5.0
4.4	30.0	2.8	0.2	0.04	0.8	2.0	10.0
4.4	30.0	2.8	0.2	0.04	0.8	2.0	50.0

Após inoculação, as placas foram incubadas a temperatura de 25±2 °C sob escuro constante. Aos 90 dias de inoculação foi avaliado a porcentagem de contaminação e indução de calos. O experimento foi realizado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) com cada tratamento composto por 10 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de petri com 4 explantes cada. Inicialmente, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre os tratamentos. Quando presentes, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

significância de 5%. A normalidade dos resíduos foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett.

Figura 1 – Inflorescência de *P. echinata* coletada no início da antese (a). Botão floral em estágio pré-antese (b). Botão floral em estágio pré-antese após abertura manual evidenciando a localização do ovário (c). Ovário de *P. echinata* utilizado como explante na indução dos calos (d).



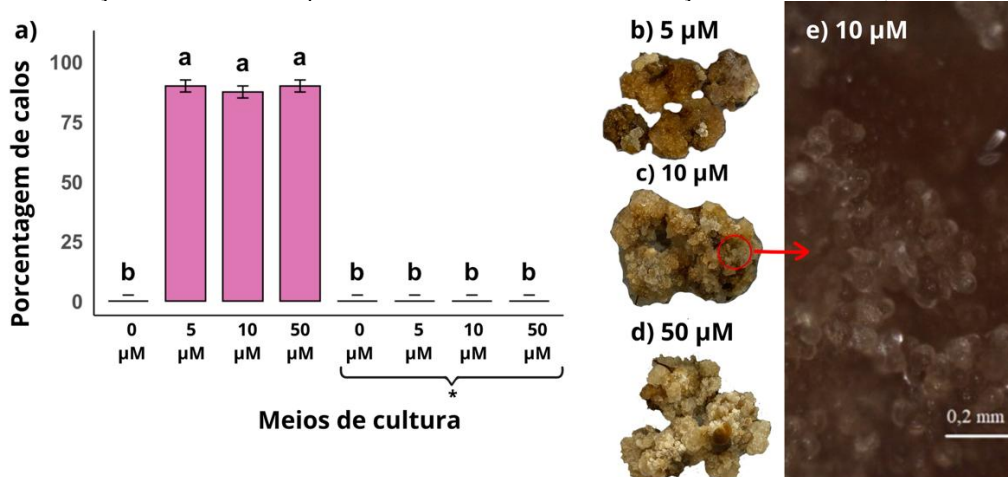
Fonte: A autora (2025). Legenda: A Barra em a representa 5 mm, em b, c e d representa a medida de 1 mm.

Resultados

O protocolo de desinfestação dos explantes demonstrou alta eficácia, resultando em menos de 4% de contaminação ao longo de todo o experimento.

Para a porcentagem de calos, as médias variaram amplamente entre os tratamentos empregados (Figura 2A), com destaque para os meios contendo apenas MS, sacarose, phytigel e com as concentrações de 2,4-D de 5, 10 e 50 μM , que apresentaram as maiores porcentagens de calogênese, sendo 90.0%, 87.5% e 90.0%, respectivamente (Figura 2B,C,D). Os demais meios que não foram suplementados com 2,4-D, ou então possuíam os componentes de caseína, cisteína, extrato de malte e carvão ativado a mais em sua composição não apresentaram crescimento de calos (Figura 2E).

Figura 2 – Médias de porcentagem de calos em ovários imaturos de *P. echinata* avaliados após 90 dias de incubação em diferentes tipos de meio de cultura e concentrações variadas de 2,4-D.



Fonte: A autora (2025). Legenda: O símbolo asterisco (*) que aparece no gráfico de porcentagem de indução de calos representa a relação dos meios de cultura que foram suplementados com os componentes de caseína, caseína, extrato de malte e carvão ativado (A). As letras B,C,D estão representando os aspectos dos calos após 90 dias de incubação nos meios suplementados com o RCV 2,4-D nas concentrações descritas ao lado das respectivas figuras. Morfologia das células ampliadas em E. Médias seguidas pela mesma letra no gráfico (a) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A coloração dos calos variou entre creme e marrom claro (Figura 2B,C,D). Os calos obtidos indicam em sua grande maioria células desorganizadas, levemente translúcidas e no formato isodiamétrico (Figura 2E).

Discussão

A eficiência do protocolo de desinfestação foi favorecida pelo uso de botões florais em estágio de pré-antese, que naturalmente apresentam menor, ou nenhuma, exposição a contaminantes externos como os microrganismos. A combinação de álcool 70% e hipoclorito de sódio mostrou-se eficaz na eliminação de microrganismos da superfície dos explantes, devido à ação desidratante do álcool sobre as células microbianas e à capacidade oxidativa do hipoclorito, que desintegra proteínas das membranas celulares, impedindo a proliferação de fungos e bactérias (Freitas *et al.*, 2014; Donini *et al.*, 2022).

Na etapa de indução de calos, o uso do regulador de crescimento 2,4-D foi indispensável. Os meios de cultura contendo esse regulador promoveram formação de tecido caloso, enquanto o meio controle (sem 2,4-D) não apresentou qualquer resposta morfogênica, corroborando estudos que indicam a necessidade da auxina sintética para ativar a divisão celular e a formação de calos em diversas espécies (Werner *et al.*, 2009; Rossato *et al.*, 2019; Taiz *et al.*, 2013).

Por outro lado, a presença de carvão ativado nos meios de cultura inibiu a formação de calos, mesmo quando o regulador estava presente. Esse efeito pode ser atribuído à alta capacidade adsorvente do carvão (Grattapaglia; Machado, 1998; Costa *et al.*, 2006), que retém compostos essenciais como vitaminas, citocininas e auxinas, além de alterar o potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de água e nutrientes pelos explantes. Apesar de em muitos trabalhos na cultura *in vitro* relatar que o uso do carvão favoreceu etapas de micropropagação (Calvete *et al.*, 2020), outros estudos, como o feito por Werner *et al.*, (2009), relataram efeito negativo com o uso do carvão na indução de calos em tecidos foliares da espécie *P. echinata*. Estudos relatam que essa limitação pode ser contornada por meio do aumento da concentração do RCV como estratégia para superar o ambiente osmoticamente desfavorável e garantir estímulo suficiente à calogênese (Feher *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2009).

Apesar das características aparentes de calos friáveis, células isodiamétricas e translúcidas, não foi possível observar até o momento regiões pró-embrionárias. Diferente do encontrado por Werner *et al.*, (2009), que, ao utilizar o mesmo regulador, na concentração de 0,5 mg/L 2,4-D verificou estruturas semelhantes a embriões somáticos nas fases globular e codiforme. Esse fato pode ser atribuído à variação nas respostas morfogênicas, que dependem diretamente do tipo, do estágio de desenvolvimento e da idade fisiológica dos explantes utilizados (Sivasankarreddy *et al.*, 2024).

A indução de calos representa uma etapa crítica na cultura *in vitro*, especialmente para espécies como o pau-brasil, cuja propagação convencional é limitada. O sucesso na formação de calos estabelece as bases para a embriogênese somática e a regeneração de plantas completas, sendo essencial para programas de conservação e multiplicação de germoplasma.

Conclusão

A adoção de um protocolo de desinfestação eficiente resultou em baixa taxa de contaminação (<4%), garantindo condições assépticas para o cultivo *in vitro* de explantes de ovários florais de *P. echinata*.

Os meios de cultura suplementados com 5.0 µM, 10.0 µM e 50.0 µM de 2,4-D, apresentaram as maiores taxas de calogênese (90.0%, 87.5% e 90.0%, respectivamente), evidenciando a eficácia desse regulador de crescimento na indução de calos. A presença de carvão ativado nos meios de cultura inibiu significativamente a formação de calos, uma vez que sua elevada capacidade de adsorção retém na superfície compostos essenciais ao desenvolvimento celular, como RCV, vitaminas e nutrientes, tornando-os indisponíveis para absorção pelos tecidos dos explantes.

Esses resultados demonstram o potencial da cultura de tecidos vegetais como ferramenta biotecnológica para a propagação do pau-brasil e oferecem subsídios importantes para o desenvolvimento de protocolos específicos voltados à conservação de espécies nativas ameaçadas.

Referências

- ARRUDA, Ana Luiza *et al.* Estabelecimento *in vitro* de sementes de *Psidium cattleianum* Sabine. **Acta Biológica Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 105-113, 2019.
- BARBEDO, C.J.; BILIA RITA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Braz. J. Bot.** 25 (4), Dez 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000007>
- BUTT, MADIHA; USMAN, MUHAMMAD; FATIMA, BILQUEES. Enhanced Seed Germination and Callogenesis under long days using Leaf Disc as Explant in Guava cultivars. **Biologia (Pakistan)**, v. 59, n. 2, p. 293-298, 2013.
- CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília., v. 20, n.2, p. 186-191, jun 2002.
- CAMPOS, F.F.; COTA, B.B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **110 (1)**, Feb 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760140243>.
- COSTA, Frederico Henrique da Silva *et al.* Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 280-283, 2006.
- CNCFlora. **Caesalpinia echinata** in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caesalpinia echinata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caesalpinia%20echinata)>. Acesso em 15 janeiro 2025.
- DONINI, L. P. *et al.* Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 517-522, 2022.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas 1. ed. **Brasília: SPI/Embrapa - CNPH**, 1998. p. 183-230. v. 1.
- FEHER, Attila; PASTERNAK, Taras P.; DUDITS, Denes. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERREIRA, Maria das Graças Rodrigues *et al.* Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Revista Saber Científico**, v. 2, n. 2, p. 56-62, 2009.
- LISBÔA, T.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Sanidade e potencial germinativo de sementes de *Caesalpinia echinata*, Lam (pau-brasil) coletadas no campus da ESALQ/USP. **Piracicaba. In: Simpósio brasileiro de patologia de sementes**, v. 8, p. 182, 2004.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- ROCHA, Tainá *et al.* Diferentes Explantes e Reguladores de Crescimento na Indução de Calos em *Dipteryx Odorata* (Aubl.) Forsyth F. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 12-16, 2024.
- ROSSATO, Marieli *et al.* Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. 46358, 2019.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants.

Biotechnol. Adv., v. 18, p. 91–120, 2000.

SIVASANKARREDDY, Kasireddy *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in Forest trees. In: Biotechnological approaches for sustaining Forest trees and their products. Singapore:

Springer Nature Singapore, 2024. p. 51-75.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de Armando Molina Divan JUNIOR *et al.* 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

WERNER, Elias Terra *et al.* Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996, 2009.

WEN, Shu-Sheng; CHEN, Lan; TIAN, Ru-Nan. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. Moutan): A review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 141, p. 1-14, 2020.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por meio da concessão de bolsa e do financiamento (T.O. nº 860/2023).