



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

### XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMIC - 2023

#### EFEITO DA AUXINA 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS COM POTENCIAL EMBRIOGÊNICO EM *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem

**Tainara Santana Gonçalves<sup>1</sup>; Alone Lima-Brito<sup>2</sup>; Rosembrando S. L. Carvalho Filho<sup>3</sup>**

1. Bolsista PEVIC/UEFS, Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tainarasantana325@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alone@uefs.br
3. Participante da pesquisa, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eagronomocarvalho@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** histologia; cultivo *in vitro*; fisális.

#### INTRODUÇÃO

Solanaceae é uma família de plantas que possui um grupo vasto de espécies com potencial alimentício, dentre elas a *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem, também conhecida como *Tomatillo* ou "Tomate casca", cultivada e comercializada no México, país que reúne 50% das espécies desse gênero, as quais são consideradas endêmicas neste local (Cobaleda-Velasco *et al.*, 2018; Delgado-Alvarado *et al.*, 2018). Além disso, esta espécie também possui potencial medicinal como agente hipoglicemiante e antioxidante (Guerrero-Romero *et al.*, 2021), antibacteriano e antifúngico (Khan, Bakht e Shafi, 2016).

A forma de propagação convencional para *P. ixocarpa* é via sexuada, ou seja, através de sementes, cuja dificuldade na produção constante de mudas com fidelidade genética e padrão de qualidade para suprir as exigências comerciais, é sua maior desvantagem (García-Osuna *et al.*, 2015). Assim, a embriogênese somática permite a obtenção de material vegetal em larga escala, em tempo reduzido, com uniformidade genética e qualidade fitossanitária, faz-se necessário a utilização de técnicas biotecnológicas, neste caso, a micropropagação pode ser uma alternativa (Silva *et al.*, 2020).

Dentre as vias de micropropagação, a embriogênese somática apresenta algumas vantagens relevantes, como a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos). Além de permitir a conservação de recursos genéticos vegetais com características genéticas superiores a partir da propagação de uma massa clonal (Carvalho *et al.*, 2013).

A indução de embriões somáticos depende, na maioria dos casos, de reguladores de crescimento, os quais são considerados os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento da resposta morfogênica induzida *in vitro* (Gaj *et al.*, 2006), sendo a auxina o principal regulador quando o assunto é embriogênese somática. Sua presença contínua no meio de cultura induz a síntese de proteínas necessárias que inicia o estágio somático até o estágio globular (Carvalho *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2020).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da auxina 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) na indução de calos e avaliar por meio de estudo histológico, seu potencial embriogênico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas provenientes de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de material vegetal asséptico após 7 dias após a germinação. Assim, foram feitas incisões nas extremidades longitudinais de seus segmentos cotiledonares, e em seguida estes explantes ( $\pm 0,4 \text{ cm}^2$ ) foram inoculados em potes (64 mm x 88 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 2,4 D (0,0; 12,5; 25,0; 37,5; 50,0  $\mu\text{M}$ ). O meio de cultura foi acrescido com 87,64 mM de sacarose, 250  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina e solidificado com 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar, tendo o seu pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e cada um dos cinco tratamentos foi constituído por seis repetições (potes), sendo cada repetição composta por quatro unidades experimentais (explantes). As culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de  $25 \pm 3^\circ \text{C}$ , na ausência de luz. Após 56 dias de cultivo foram avaliados: porcentagem dos explantes que formaram calos (%EFC) e porcentagem de calos que apresentaram formações globulares (%CFG).

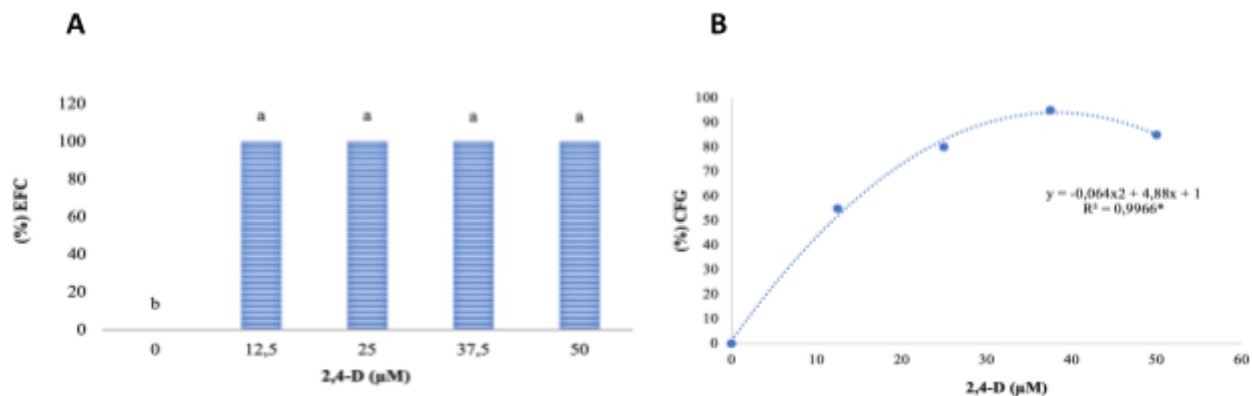
Para análise histológica, segmentos cotiledonares ( $\pm 0,4 \text{ cm}^2$ ) e plântulas cultivadas *in vitro* com 7 dias após germinação foram inoculados em potes (64 mm x 88 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com 50,0  $\mu\text{M}$  de 2,4 D e acrescido com 87,64 mM de sacarose, 250  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina e solidificado com 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar, tendo o seu pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ .

As culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de  $25 \pm 3^\circ \text{C}$ , na ausência de luz. Após 56 dias amostras dos calos foram coletadas e fixadas em 4 % (v/v) formaldeído e 2,5 % (v/v) glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram desidratadas duas vezes (durante 1 h cada) em séries crescentes de etanol (70, 90, e 100 %). Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com HistoResin® (Leica) e etanol a 100% (1:1, v/v) durante 12 h e posteriormente em HistoResin® a 100% durante 24 h, seguido de incorporação em HistoResin® (Silveira *et al.*, 2013). A análise histológica foi realizada utilizando um estereomicroscópio e uma câmera digital, sendo que as secções longitudinais (10  $\mu\text{m}$  de espessura) foram obtidas utilizando um micrótomo. Para a caracterização estrutural, as secções foram coradas durante 30s com 1 % de solução de azul toluidina (TB-O) contendo 1 % de borato de sódio (O'brien *et al.*, 1964).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

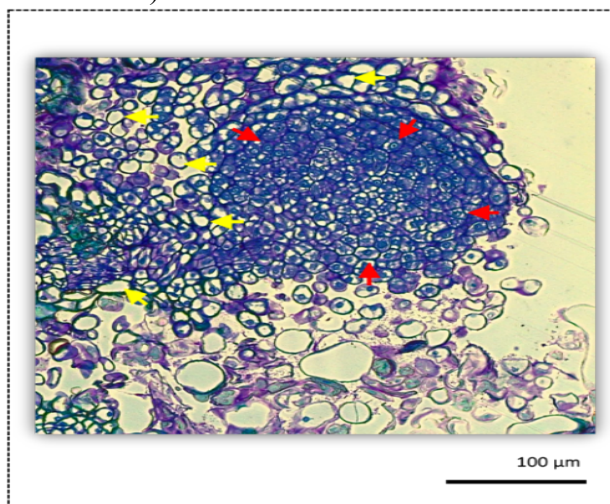
A análise de variância demonstrou efeito altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ) em todas as variáveis analisadas, ao analisar o percentual de explantes responsivos para formação de calos (%EFG), verificou-se que a suplementação do meio de cultivo com 2,4-D é preponderante para formação de calos, com taxa máxima (100%) em todos os tratamentos na presença da auxina, enquanto no controle não houve calogênese (Figura 1A). As auxinas, entre elas o 2,4-D, são responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação e rediferenciação, que possibilitam a formação de calos (Silva *et al.*, 2020; Torres & Caldas, 1990).

Além da concentração dos fitormônios, diversos fatores podem influenciar na formação de calos em uma espécie, como a composição do meio de cultura, condições de luz, e o tipo de explante (Torres & Caldas, 1990). É importante que o tecido vegetal contenha a presença de zonas meristemáticas capazes de expressar a totipotência celular, como é o caso do tipo do explante selecionado para esse estudo (Pinto *et al.*, 2018). Determinação da concentração do regulador vegetal é fundamental, como foi descrito por Pinto *et al.* (2018) em estudo com a espécie *Amburana cearenses*, os quais relataram que a concentração de 26,46  $\mu\text{M}$  de 2,4-D foi considerada ideal atingindo um percentual de 99,38 % para a formação de calos que tiveram a origem a partir de explantes de cotilédone.



**Figura 1:** A: Percentual de explantes responsivos para a formação de calos (%EFC) e B: Percentual de calos com formações globulares (%CFG) oriundos de segmentos cotiledonares de *Physalis ixocarpa* aos 56 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D. Feira de Santana-BA, 2023.

Analisando o percentual de calos que apresentaram formações globulares (CFG%), verificou-se que a variável apresentou um comportamento quadrático ascendente ( $p \leq 0,05$ ) com o aumento da concentração de 2,4-D. Ao resolver a equação polinomial, verificou-se que o ponto de máxima (94% de calos com formações globulares) é atingido com o valor calculado de 38,1 µM de 2,4-D (Figura 1B). Ao submeter os calos que apresentaram formações globulares a análise histológica, verificou-se que as células possuíam formato isodiamétrico, núcleos proeminentes, citoplasma denso e padrão de divisão simétrico (Figura 2 - setas vermelhas), cujos aspectos estão relacionados com a competência embriogênica. Por outro lado, ao redor destas células, existem células sem núcleos, altamente vacuoladas, as quais possuíam característica de massas cologênicas indiferenciadas (Figura 2 - setas amarelas).



**Figura 2:** Aspecto histológico de células diferenciadas (setas vermelhas) e não diferenciadas (setas amarelas) a partir de calos de *Physalis ixocarpa* que apresentaram formações globulares aos 56 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo 50 µM de 2,4-D. Feira de Santana - BA, 2023.

Formações globulares são consideradas características morfológicas típicas de calos com potencial embriogênico, cuja presença e distribuição ocorre na superfície do calo em forma de nódulos (Maciel *et al.*, 2010). Esse tipo de estrutura também foi encontrado por Silva *et al.* (2020) em seu estudo com a *Myracrodruon urundeuva*, os quais descreveram que na superfície dos calos as estruturas globulares encontradas eram indicativas de embriões somáticos em estágio globular. Pádua *et al.* (2015), em estudos com Bananeira cv. Prata-Anã (*Musa spp*) relataram que os calos originaram nódulos na superfície e ao realizar análise histológica, constataram aglomerados celulares

organizados, apresentando divisão mitótica constante e ao redor existiam células com vacúolos proeminentes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A auxina 2,4-D é eficiente para a indução de calos com potencial embriogênico a partir de explantes cotiledonares de *Physalis ixocarpa*. Estudos posteriores são necessários para acompanhar a ontogênese da embriogênese somática a partir dos calos obtidos.

## REFERÊNCIAS

- CARVALHO, A. C. P. P. de et al.2013. *Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais*. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed., Embrapa.13-53 p.
- COBALEDA-VELASCO,M. et al.2018. Rapid Determination of Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Properties of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. and *Physalis angulata* L. by Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares, *Analytical Letters*.51(4):523-536p.
- GAJ, M.D, et al.2006. Mutantes de resposta hormonal de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. prejudicada na embriogênese somática. *Plant Growth Regulation*, 49,183-197p.
- GARCÍA-OSUNA,H. T. et al. 2018. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12,2301-2311p.
- GUERRERO-ROMERO, F. et al.2021. Hypoglycemic and antioxidant effects of green tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) calyxes extracts. *Journal of food biochemistry*.45, e13678p.
- KHAN, W; BAKHT, J; SHAFI, M .2016. Antimicrobial potentials of different solvent extracted samples from *Physalis ixocarpa*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*.29, 467-475p.
- MACIEL, S. et al.2010. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 32, 263–267p.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*.15, 473-497p.
- O'BRIEN, T.P; FEDER, N; MCCULLY, M.E.1964. Coloração policromática de paredes celulares vegetais por azul de toluidina. *Protoplasma*, 59, 368-373p.
- PÁDUA, M. et al.2015. Histological and ultrastructural analysis of the Banana cv. Prata-Anã embryogenic calluses and cell suspension. *Revista de Ciências Agrárias*.58.
- PINTO, D. et al.2018. Efeito do 2,4-d na indução de calos em *Amburana cearensis*(ALLEMÃO) A. C. Smith.in: Anais dos Seminários de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana.
- SILVA, T.S. et al. 2020. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Ciência Florestal*, 30(3):700-717p.
- SILVEIRA, V; MACEDO, A; SANTA-CATARINA, C. 2013. Alterações morfológicas e do conteúdo de poliaminas em calos embriogênicos e não embriogênicos de cana-de-açúcar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,114(3): 351-364p.
- TORRES, A. C; CALDAS, L.S. (Ed.). 1990. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ.