

EIXO TEMÁTICO:

FORMA DE APRESENTAÇÃO:

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA, INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CALOS EM *Bowdichia virgilioides* Kunth

Marco Aurélio Boaventura Filho¹

Elba Sharon Dias²

Plinio Rodrigues dos Santos Filho³

Resumo

A sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae com ampla dispersão pelo Brasil. Sua madeira de alta densidade e longa durabilidade é empregada na construção civil e na fabricação de móveis. É bastante utilizada em reflorestamentos, na recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente. Além de sua importância madeireira, essa planta possui características medicinais relevantes devido à presença compostos bioativos, incluindo antimaláricos hipoglicemiantes, inibidores da enzima acetilcolinesterase, anti-úlceras e anti-diabético. Devido ao seu corte intensivo já é considerada uma espécie quase ameaçada, sendo a formação de mudas limitada em função da dormência tegumentar apresentada pela espécie. Nesse sentido, a cultura de tecidos de plantas constitui uma ferramenta biotecnológica interessante para o estudo e conservação dessa espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para indução de calos e embriões a partir de diferentes explantes de Sucupira-preta, além de avaliar sua viabilidade celular e realizar estudos bioquímicos e fitoquímicos no intuito de avaliar o potencial medicinal do material obtido *in vitro*. Os explantes (folhas, segmentos nodais e raízes), obtidos a partir de plantas matrizes *in vitro*, foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações (0; 1,0; 5; 10 e 20,0 µM) de 2,4 D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) e BAP (6-benzilaminopurina) e suas combinações. Após 60 dias foram analisadas a presença ou ausência de calos, área coberta por calo e presença ou ausência de embriões somáticos. Os calos foram retirados do explante e subcultivados em 1 µM de 2,4D + 10 µM de BAP contendo diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µM) de putrescina. Para todos os explantes o maior percentual de calogênese ocorreu nos tratamentos 0,5 µM de 2,4 D com 20 µM de BAP e 1,0 µM de 2,4 D com 20 µM de BAP que foram estatisticamente iguais entre si e diferentes dos demais. Calos oriundos destes tratamentos apresentaram alta atividade metabólica verificada pela capacidade de redução do TTC e não houve diferença estatística entre os calos dos diferentes explantes. Tratamentos com putrescina nos calos demonstraram ter

¹Aluno de Mestrado da UNIFAL – Campus Alfenas. marcao_biotech@yahoo.com.br

²Aluna de Mestrado da UNIFAL – Campus Alfenas, elbasharon@yahoo.com.br

³Prof. Dr. da UNIFAL– Campus Alfenas, pliniosant@hotmail.com

um efeito negativo sob a potencial embriogênico da célula. O maior conteúdo de açúcares totais foi obtido com o calo tratado em 500 μM de putrescina. Embriogênese somática direta ocorreu nos explantes radiculares tratados com 5 e 20 μM de BAP. Foram observados embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento (globular, torpedo, cordiforme e cotiledonar). Experimentos adicionais serão realizados para caracterização bioquímica dos calos e melhor compreensão do processo de embriogênese somática dessa espécie.

Palavras Chave: Embriogênese, calogênese, TTC, açúcares.

INTRODUÇÃO

Bowdichia virgilioides Kunth é uma espécie arbórea de grande porte, decídua, heliófita, anemocórica, típica de savana tropical. É considerada uma planta pioneira e adaptada a terrenos secos e pobres, pertencente, assim como outras leguminosas, à família Fabaceae (BRANDÃO, FERREIRA, 1991; LORENZI, 1992).

É uma espécie comumente distribuída nas terras baixas amazônicas do Brasil, Bolívia e no norte da América Central, encontrada tipicamente em campos de cerrado. É comumente conhecida pelos nomes populares sucupira-preta, sucupira-do-cerrado, sucupira-do-campo, angelim-amargoso e coração-de-negro (ALMEIDA, et al., 1998; DEHARO, et al., 2001).

De acordo com Lorenzi (1992), por ter naturalmente alta densidade e longa durabilidade sua madeira é muito empregada na construção civil e na fabricação de móveis. Sua madeira estriada e pesada, de cerne pardo escuro é empregada como, por exemplo, em dormentes, postes, cercas, embarcações e móveis de luxo (SMIDERLE, 2003). *Bowdichia virgilioides* tem sido usada também em trabalhos de reflorestamento e de colonização de espécies, como demonstra Arantes, et al. (2015).

Além de sua importância madeireira, *Bowdichia virgilioides* é uma espécie já utilizada por comunidades indígenas como mostra Bourdy, et al. (2000), onde decoctos da planta são utilizados no tratamento de disenteria, malária e até leishmaniose. Na medicina popular, suas sementes são utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite e doenças de pele e a sua casca é aproveitada como um agente antidiabético e anti-inflamatório de uso tópico (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Demonstra-se a importância desta planta por sua inclusão na primeira edição da farmacopeia brasileira (BRANDÃO et al., 2006) e por vários trabalhos que têm analisado suas propriedades medicinais, identificando e correlacionando princípios ativos presentes na espécie. Almeida et al. (2000) demonstraram que o óleo essencial extraído de folhas de *Bowdichia virgilioides* apresentou atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos. O uso de *B. virgilioides* como uma forma complementar de tratamento de diabetes foi citado inicialmente por Oliveira e Saito (1989) e foi melhor investigado por Silva et al. (2015) que verificaram benefícios em parâmetros bioquímicos e fisiológicos alterados nessa doença. Estudos relatam também ação antinociceptiva, anti-inflamatória, ansiolítica e inibidora da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO, et al., 2006; VIEIRA, et al., 2013, THOMAZZI et al., 2010). Foi observado que dois isoflavonóides de *B. virgilioides* atuam como eficientes larvicidas contra *Aedes aegypti* (BEZERRA-SILVA, et al. 2015).

Estudos químicos com essa planta revelaram a presença de alcalóides, terpenóides e derivados de benzofurano nas cascas do caule, (TORRENEGRA, 1989; MARINHO, 1994; BARBOSA-FILHO, 2006) constituintes voláteis, óleos essenciais, flavonóides e isoflavonóides nas raízes, (ARRIAGA, 1998; VELOZO, 1999; ARRIAGA, 2000) taninos na região da entrecasca e em folhas (THOMAZZI, 2010), geraniol, cariofileno e antocianinas em frutas (JORGE NETO, 1970).

A cultura de tecidos consiste no cultivo *in vitro* sob condições assépticas de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições controladas (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Essa técnica tem sido considerada uma metodologia quase indispensável no que se refere à propagação de espécies de interesse agrícola, farmacêutico, paisagístico e silvicultural. Dessa forma, considera-se que para o sucesso do cultivo *in vitro* são necessários conhecimentos de biologia vegetal no que tange aos aspectos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos (ALMEIDA, 2012).

O cultivo *in vitro* de plantas é baseado na totipotencialidade das células vegetais (VOGEL 2005), o que permite que a célula sofra desdiferenciação, ou seja, perca as características diferenciadas e reinicie a divisão celular quando removidas da planta e colocadas em meio de cultura específico. Em tese, qualquer célula viva da planta é capaz de originar um novo indivíduo completo, porém tecidos meristemáticos costumam apresentar melhores resultados (VERDEIL et al., 2007). O fragmento de tecido da planta de interesse utilizado no cultivo *in vitro* é denominado explante, o qual é colocado em um meio nutritivo que permita o desenvolvimento adequado do material utilizado, de acordo com o objetivo do trabalho, sempre sob condições assépticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999). O meio de cultura pode ter diversas composições, dependendo do propósito final do experimento. De maneira geral, ele é composto de macro e micronutrientes, carboidratos, reguladores de crescimento e vitaminas, e a variação destes componentes pode controlar o padrão de desenvolvimento do vegetal *in vitro* (TORRES et al., 1998).

Uma das estratégias para produção de mudas *in vitro* é a embriogênese somática, processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos sem a ocorrência de fusão de gametas (GUERRA et al., 1999; JIMENES, 2001). É uma técnica promissora para a produção de mudas em grande escala e é um sistema atrativo para estudar a morfologia, bioquímica, mecanismos genéticos e moleculares do desenvolvimento embrionário. (MORCILLO et al, 2007; LOYOLA-VARGAS et al. 2008).

Na embriogênese somática existem dois padrões básicos de expressão. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de calo. O segundo corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, onde as células apresentam-se em diferentes estádios de diferenciação e podem adquirir novas competências. Em ambos os casos, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico (TORRES et al., 1999).

O processo de formação de calo, também conhecido como calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação vegetativa em massa. As células dos calos também podem ser úteis quando se deseja realizar manipulações genéticas, como poliploidizações, transformações ou hibridizações, bem como obtenção de metabólitos secundários (VENTURIERI, 2004). Outro aspecto relevante da cultura

de calos é seu potencial uso para a obtenção de metabólitos secundários bioativos, em alternativa ao extrativismo de plantas com propriedades medicinais (KARUPPUSAMY, 2009). Além disso, extratos de massas calogênicas também têm sido avaliados em diferentes sistemas biológicos a fim de se conhecer sua atividade e potencial aplicação (SOKMEN et al., 2004).

A indução de embriões somáticos a partir de tecidos maduros da planta, ou pelo menos, a partir de tecidos não-seminais, tal como partes da folha ou segmentos radiculares é um objetivo importante a ser alcançado em espécies florestais. Embriões somáticos parecem estar associados com a estabilidade genética e histológica das plantas regeneradas (CUENCA et al., 1999). Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e a atmosfera no interior dos frascos durante o cultivo podem ser fundamentais para o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear o processo de diferenciação celular (FURTADO, 2010).

Porém, o fator mais explorado no processo de embriogênese somática é a utilização dos reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento são substâncias que influenciam processos fisiológicos das plantas quando em concentrações apropriadas (FRANKENBERGER; ARSHAD, 1995).

Entre os reguladores de crescimento, as auxinas e as citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas (MACIEL, 2001). As auxinas desempenham um papel essencial na indução e posterior desenvolvimento dos embriões (ZIMMERMAN, 1993). As principais auxinas utilizadas são o ácido indol 3-acético (AIA), o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido indol butírico (AIB), o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 3,6-dicloroanísico (dicamba) e o ácido 4-amino 3,5,6 tricloro-2-piridinacarboxílico (picloram) (GUEDES, 2008).

As citocininas atuam na divisão celular sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). As mais utilizadas no cultivo *in vitro* são a 6- benzilaminopurina (BAP), seguido pela cinetina (CIN), zeatina (ZEA) e thidiazuron (TDZ) (RAEMAKERS et al., 1995).

METODOLOGIA

Sementes de *Bowdichia virgilioides* foram coletadas na região de Alfenas-MG e armazenadas à temperatura ambiente em local livre de umidade. No momento do uso, foram submersas em ácido sulfúrico por 10 minutos para a quebra de dormência tegumentar e submetidas a uma tríplice lavagem em água esterilizada autoclavada. Posteriormente, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo por 5 minutos e novamente lavadas em água esterilizada por três minutos. Os explantes foram inoculados em tubos contendo 20 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar.

Para indução de calos segmentos foliares de 1 cm² e segmentos nodais e radiculares de 1 cm foram obtidos a partir das plantas de Sucupira germinadas *in vitro* como descrito acima. Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de Ágar e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento (0; 0,5; 1,0;

5; 10 e 20,0 $\mu\text{mol/L}$) ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) a 6-benzilaminopurina (BAP) e suas diferentes combinações. As placas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz. A avaliação foi feita aos 60 dias após a inoculação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de calos formados e área coberta por calos de acordo com Warchol et al. (2015).

Os calos obtidos no experimento anterior foram retirados do explante e subcultivados em 1 μM de 2,4D + 10 μM de BAP contendo diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 μM) de putrescina. Foi feita a opção por utilizar calos oriundos apenas de segmento nodal no intuito de evitar qualquer tipo de influência do explante. A concentração dos reguladores 2,4 D e BAP foi selecionada com base nos resultados de indução dos calos conforme discutido abaixo. Os calos permaneceram em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz durante 60 dias quando foram coletados, pesados e armazenados a -80°C para as análises bioquímicas. Para a determinação da viabilidade os calos foram coletados e utilizados imediatamente.

Amostras dos calos foram avaliadas com utilização do método colorimétrico para análise da viabilidade celular com o 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) que reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. A viabilidade celular foi determinada em 5 calos por tratamento. Amostras de 50 mg de calos foram coletadas e incubadas no escuro em 5 mL de solução de TTC a 0,5% em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0 por 15 horas. As amostras foram então lavadas em água deionizada e incubadas em 3 mL de etanol 94% a 80°C , durante 5 minutos sob leve agitação (80 rpm). Após 1 minuto de centrifugação a 5000 x g, durante 1 minuto o extrato formazan foi quantificado por espectrofotometria na faixa de 487nm.

Porções de 50 mg de tecido fresco foram retirados dos calos e levemente macerados com auxílio de um bastão de vidro. Após a maceração, foram adicionadas Três gotas do corante Azul de Evans 0,1%, o qual permaneceu em reação por três minutos. Após esse período, foi retirado o excesso de corante e adicionado três gotas de Carmim acético 2%, o qual permaneceu em reação pelo mesmo tempo. Por fim, o excesso de corante foi retirado, a massa celular foi distribuída sob a superfície de uma lâmina e analisada em microscópio de luz com câmera digital acoplada (DURZAN, 1988).

Para extração dos metabólitos, o material vegetal foi macerado em 2 mL de solução de metanol/clorofórmio/água (12:5:3, v/v) e incubado a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 30 min. e o sobrenadante misturado com clorofórmio e água (4:1:1,5, v/v). A fase aquosa foi usada para análise de aminoácidos e açúcares solúveis totais. O amido foi extraído a partir do pellet oriundo da centrifugação pela incubação com ácido perclórico 30%. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

O conteúdo total de aminoácidos foi determinado de acordo com Yemm e Cocking (1955). Alíquotas dos extratos foram adicionadas em água destilada totalizando 1 mL. Posteriormente 1,7 mL dos seguintes reagentes foram adicionados: tampão citrato de sódio 0,2 M pH 5 (0,5mL), ninhidrina 5% em metilcelossolve (0,2 mL) e KCN 2% em metilcelossolve (1 mL). Essa mistura foi submetida a agitação e aquecida a 100°C por 20 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente, 1,3 mL de etanol 60% foi adicionado às amostras e determinada a absorvância a 570 nm. Foi realizada a quantificação com base em curva padrão de glutamina, previamente plotada.

Os açúcares solúveis totais foram determinados como descrito por Yemm e Willis (1954). Alíquotas da fração aquosa obtida foram misturadas a água totalizando 1 mL e então misturadas a 2 mL do reagente de antrona (20 mg de antrona, 500 µL de água e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). As amostras foram agitadas e posteriormente aquecidas a 100°C por 5 min. A absorbância foi determinada em 620 nm e a quantificação feita com base em curva padrão de glicose, previamente plotada.

O conteúdo de amido foi determinado como descrito por McCready et al. (1950). Ao precipitado obtido da extração dos metabólitos primários será adicionado 1 mL de ácido perclórico 30%. As amostras foram agitadas ocasionalmente por 10 min. e a partir da solução obtida foi determinado o teor de amido pela reação com antrona da mesma forma como descrito acima.

Os experimentos de cultura de tecidos foram plotados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 1 placa contendo 5 explantes. Os métodos analíticos foram realizados com 4 repetições, sendo cada repetição composta por uma triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ou Scot Knott a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecer condições de cultivo e cultura para calogênese, investigando qual o efeito dos tratamentos estabelecidos nos mesmos, são passos essenciais para elaboração de um protocolo de indução de calos. Foram avaliadas diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e suas diferentes combinações na indução de calos em explantes rizoidais, foliares e de segmentos nodais de Sucupira Preta. De acordo com Scotton et al. (2013), a fonte do explante, a concentração e a combinação de reguladores de crescimento estão entre os fatores mais importantes para indução de calos. Foram induzidos calos a partir dos três explantes utilizados (raízes, segmentos nodais e folhas). Como apontam Scotton et al. (2013) o tipo de explante foi um fator relevante, já que a raiz foi mais susceptível à calogênese que os segmentos e principalmente que as folhas.

Observa-se que não houve indução de calos no controle (ausência dos reguladores) e na presença do BAP sem o 2,4-D. Lima et al., (2008) também estudaram a interação de diferentes concentrações de 2,4-D com BAP e observaram que não houve formação de calos na ausência de reguladores, assim como foi apresentado neste presente trabalho. Porém, na presença da citocinina BAP, sem o 2,4-D foram observadas brotações e o desenvolvimento de embriões somáticos em explantes rizoidais, resultado semelhante ao trabalho de Santos, et al., (2014).

A importância do 2,4-D é evidenciada, uma vez que os tratamentos contendo apenas esta auxina resultaram na formação de calos, enquanto os tratamentos apenas com a citocinina BAP, como mencionado acima, não formaram calos. Tal resultado reforça a tese que o ácido 2,4-diclorofenoxiacético tem se mostrado ser um dos mais eficientes reguladores para indução de calos, além também de ser utilizado para a indução da embriogênese somática em diferentes espécies em concentrações variadas, levando as células dos explantes a uma condição de estresse que altera seu metabolismo e resulta na formação do calo (FEHÉR, et al., 2003; ZHANG, et al., 2007). Os trabalhos

de Castro (2009) e de Rosado, et al (2009) obtiveram resultados semelhantes, onde os calos foram obtidos apenas com o 2,4-D.

Contudo, a formação ou não de uma massa calogênica é apenas o primeiro fator a ser considerado. Diferentes trabalhos descrevem que a observação de padrões de coloração, friabilidade e intensidade do calo são características igualmente importantes (KUMAR et al., 2014; WARCHOL et al., 2015). Por essa razão, os calos obtidos foram também analisados com relação à área coberta por calos.

Esse tipo de análise, embora subjetiva, tem sido frequentemente empregada em trabalhos que visam a indução de calos. A análise da área coberta do calo foi avaliada por uma escala elaborada, parâmetro também já utilizado por DOS SANTOS, et al., 2003; SANTOS, et al., 2014 e WARCHOL, et al., 2015.

Os tratamentos que apresentaram as maiores áreas cobertas por calo para raízes e segmentos nodais foram 1,0 μ M 2,4 D + 10 μ M BAP e 1,0 μ M 2,4 D + 20 μ M BAP. Para as folhas os tratamentos com maior área coberta foram 0,5 μ M 2,4 D + 1 μ M BAP, 0,5 μ M 2,4 D + 20 μ M BAP, 1,0 μ M 2,4 D + 5 μ M BAP.

Os explantes de raiz se mostraram mais sensíveis aos tratamentos, sendo formados calos em todos os tratamentos, exceto os que não eram suplementados com 2,4-D, já os explantes foliares demonstraram ser menos sensíveis, com o menor número de calos por tratamento, explica-se este resultado talvez pela complexidade tecidual foliar em relação ao rizoidal, uma vez que a folha possui uma anatomia e fisiologia mais elaborados do que a raiz. Os explantes de segmentos nodais obtiveram um número mediano de calos por tratamento e um crescimento significativo nos tratamentos ótimos selecionados, seguindo a afirmativa de Carvalho et al. (1974), que consideram essencial a combinação entre 2,4-D e uma citocinina para a proliferação de calos de explantes foliares e nodais.

Estes resultados demonstram a importância e a eficiência da utilização da citocinina BAP com a auxina 2,4-D para obtenção de calos e também a capacidade que o 2,4-D tem sobre a formação calogênica, uma vez que ele sozinho nos tratamentos com 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20 μ M sem a presença de BAP resultaram em formação calogênica seguindo a afirmativa de Carvalho et al. (1974), que consideram essencial a combinação entre 2,4-D e uma citocinina para a proliferação de calos de explantes foliares e nodais.

Podemos classificar os métodos de viabilidade celular em dois grupos: aqueles que coram apenas as células mortas, e aqueles que coram apenas as células vivas, uma vez que a coloração é um produto da atividade metabólica celular (SILVA e MENENDÉZ-YUFFÁ, 2006). Para a determinação da viabilidade celular foram utilizadas 2 metodologias: Azul-de-Evans e TTC.

A análise dos calos pelo teste do tetrazólio demonstrou que não há diferença estatística dos tratamentos (50, 100, 500 e 1000 μ M de putrescina) em relação ao controle ($p > 0,05$). Contudo, há diferença estatística dentro dos tratamentos: os calos tratados com 50 μ M apresentaram maiores taxas de viabilidade celular em relação aos demais, esta relação indica que os calos apresentaram maior atividade metabólica sob baixas concentrações de putrescina. Isto porque nas mitocôndrias o TTC é reduzido à trifetilformazan pela cadeia respiratória, agindo como acceptor final de elétrons no lugar do oxigênio. Essa reação corresponde a respiração celular, indicando atividade metabólica e viabilidade celular (DIAS e ALVES, 2008).

O teste citotóxico da dupla coloração com carmim acético e azul de evans, é eficiente na identificação massas pró-embriogênicas, em diferentes subcultivos de calos,

pois células pró-embriogênicas são coradas pelo Carmim acético de maneira rápida e simples com a utilização de microscopia de luz (STEINER et al., 2005).

Não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com 50, 100, 500 e 1000 μM com putrescina ($p > 0,05$). Entretanto, dentro dos tratamentos de 500 μM de putrescina e do controle, há uma diferença entre a quantidade de células coradas por carmim acético e por azul de evans, sendo que foi maior o número de células coradas por carmim acético, demonstrando que o controle apresentou uma maior capacidade embriogênica do que os tratamentos com 50, 100 e 1000 μM . A reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular relacionando-se assim à sua capacidade embriogênica (DURZAN, 1988 E STEINER, et al, 2005). Dessa forma os tratamentos com a putrescina demonstraram ter um efeito negativo sob a potencial embriogênica da célula. As células embriogênicas são pequenas e morfológicamente constituídas de núcleo volumoso, conteúdo citoplasmático denso e parede celular fina devido à alta atividade metabólica, ao passo que as não embriogênicas se distinguem pela coloração azul, núcleos pequenos, citoplasma menos denso, sendo mais alongadas em função do maior grau de vacuolização (APPEZATO-DA-GLÓRIA, et al., 2005).

Essas células coradas de azul são normalmente vacuoladas, essa vacuolização é um dos primeiros sinais de morte celular, que vem acompanhado de rupturas na membrana e o corante Azul-de-Evans consegue penetrar nessas células através de rupturas da membrana, colorindo o interior dessas células em azul (BHARGAVA, et al., 2007).

A relação entre poliaminas e morfogênese é consideravelmente abordada na literatura (NOCEDA, et al., 2009; MALÁ, 2012; CHENG, et al., 2015; REIS, et al., 2016), porém a ação dessas moléculas é bastante variável entre as espécies. Vondráková et al., 2015 demonstraram que a aplicação exógena de putrescina estimulou a divisão e aumento de volume de culturas embriogênicas de *Picea abies*, contudo aumentou a taxa de embriões mal formados. Esse resultado demonstra que não há uma relação clara entre atividade metabólica e competência embriogênica. Já Reis et al., 2016 observaram resultado oposto. A aplicação exógena de 500 μM putrescina aumentou o número de embriões somáticos em calos de cana de açúcar.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que, embora haja um ligeiro aumento na viabilidade celular pelo método do TTC com a adição de 50 μM de putrescina, não houve aumento na competência embriogênica das células em resposta à adição dessa poliamina.

O conhecimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais, pode fornecer informações importantes relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições do cultivo *in vitro*. A caracterização bioquímica dos calos pode evidenciar as mudanças que ocorrem nas diferentes fases do seu crescimento, fornecendo dados importantes relacionados ao processo morfogenético *in vitro* (VASCAONCELOS, et al. 2012). Dessa forma, a análise do conteúdo de açúcares totais e de amido nos provém a capacidade de identificar fatores que desencadeiam mudanças fisiológicas nos explantes, importantes para o cultivo de calos de *B. virgilioides*.

Os teores de açúcar não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos e em relação ao controle, com exceção do tratamento com 500 μM de putrescina, que diferiu estatisticamente dos demais, apresentando o maior conteúdo de açúcares. Valor este bem superior ao encontrado por Nogueira et, al. 2008 em calos de

Byrsonimia intermedia A. Juss, porém de valor mais próximo ao encontrado por Vasconcelos, et al., 2012 que obtiveram 43,32 mg g⁻¹ de açúcares totais. Este tratamento também foi o que apresentou maior competência embriogênica, o que pode representar uma correlação entre a quantidade endógena de açúcares e a capacidade embriogênica.

Os teores de açúcares em calos são muito variáveis, havendo tendência geral de declínio, com o teor máximo sendo verificado, geralmente, no dia da inoculação dos explantes (SERRA et al., 2000).

O conteúdo de amido e açúcares totais estão diretamente associados, pois o amido é um polissacarídeo utilizado como reserva energética e quando hidrolisado é transformado em glicose para uso imediato da célula. Então supomos que aos 60 dias de cultivo houve uma hidrólise do amido. Em cultura de tecidos é usual empregar uma fonte externa de carbono como a sacarose. Essa molécula pode ser precursora da síntese de polissacarídeos após sua hidrólise pela sacarose sintase ou invertase. Sua hidrólise fornece as hexoses necessárias para síntese de compostos estruturais e obtenção de energia pela célula (MARTIN et al., 2001).

Os valores do conteúdo de amido não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle, nem dentro dos tratamentos. Contrário aos açúcares, mesmo com 500 µM de putrescina não houve diferença no conteúdo de amido.

De acordo com Silveira et al. (2004), em suspensões celulares de *Pinus tadea* L., os níveis de amido foram reduzidos mediante a adição de 2,4-D ao cultivo. Como o cultivo dos calos de *J. curcas* foi iniciado em meio contendo tal regulador, este pode ter influenciado de forma semelhante. Nogueira (2006), avaliando o teor de amido por períodos de cultivo em murici-pequeno, também observou baixos teores de amido no cultivo inicial, do mesmo modo, com a adição de 2,4-D ao meio de cultura.

A análise dos aminoácidos totais em calos tratados com a putrescina não apresentou diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle (sem putrescina), assim como não apresentou diferença nos tratamentos. Ulanov e Widholm, (2010) analisaram calos de *Zea mays*, tratados com manitol e não houve diferença significativa nos aminoácidos totais, porém a adição do manitol possa ter influenciado nos resultados, já em calos de *Jatropha curcas* L., Dos Santos, et al., (2010) demonstraram que houve um declínio na quantidade total de aminoácidos, porém sem tratamento adicional nos calos. Em calos de ipê branco, Abbade (2008) demonstrou que os teores de aminoácidos se elevaram.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de processos de calogênese tem várias aplicações e contribuições para o estudo de morfogênese *in vitro*, porém os parâmetros de classificação calogênica mostram ser subjetivos e parciais, sendo assim a elaboração de melhores critérios para avaliação são essenciais para novos trabalhos nesta área.

A quantificação dos metabólitos primários analisados neste presente trabalho (açúcares, amido e aminoácidos) auxilia para uma melhor interpretação e entendimento sobre os processos da calogênese nesta espécie, a sua análise em conjunto com a interpretação da viabilidade celular torna-se mais completa ainda ao se analisar o metabolismo celular com sua atividade metabólica.

O processo de embriogênese somática ainda é pouco compreendida, os resultados deste presente trabalho confirmam a relação de determinados reguladores e

de poliaminas com o processo embriogênico, porém estudos posteriores são necessários para uma melhor compreensão de vias bioquímicas e sinalização celular que atuam diretamente neste processo.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.C. **Aspectos do cultivo in vitro de ipê-branco**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, MG.

ALBUQUERQUE K. A.; GUIMARÃES, R. M.; ALMEIDA, I. F.; CLEMENTE, A. C. S. Métodos para superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Cienc.Agrotec.**, v. 6, p. 31, 2007.

ALMEIDA, S. D.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, v. 464, 1998.

ALMEIDA J. R.; SILVA-FILHO R. N.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 16, p. 638-41, 2000.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação in vitro de brotações de Eucalyptus citriodora (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 107 p. 2012.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA; HAYASHI, ADRIANA HISSAE; BEATRIZ. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. **Australian Journal of Botany**, v. 53, n. 3, p. 273-279, 2005.

ARANTES, C. S.; RODRIGUES-SOUZA, J.; PRADO JÚNIOR, J. A.; VALE, V. S.; OLIVEIRA, R. M. C. Ação facilitadora de *bowdichia virgilioides* kunth. (fabaceae) na colonização de espécies em uma área de cerrado sentido restrito. **Caminhos da Geografia**, v. 16, p. 15-16, 2015.

ARRIAGA, M. C.; MACHADO, M. I.; GOMES, G. A.; CRAVEIRO, A. A.; Volatile constituents from roots of *Bowdichia virgilioides*, **Kunt. J Essent Oil Res**, v. 10, p. 205- 206, 1998.

ARRIAGA A.M.; GOMES G.A.; BRAZ-FILHO R. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 211-212, 2000.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.

BEZERRA-SILVA, C. P.; SANTOS, J. C.; SANTOS G. K. N.; DUTRA, K. A.; SANTANA, A. L. B. D; MARANHÃO, C. A.; NASCIMENTO, M. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. Extract of *Bowdichia virgilioides* and maackiain as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**. v. 153, p. 160-164, 2015.

BOURDY, G.; DEWALT, S. J.; CHÁVEZ; DE MICHEL, L. R.; ROCA, A.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **J. Ethnopharmacol**, v. 70, p. 87-109, 2000.

BRANDÃO, M.; FERREIRA, P. B. D. **Flora apícola do cerrado**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 4-8, 1991.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 408–420, 2006.

CARVALHO, F. J. P. C.; CARVALHO, P. C. T.; CRÓCOMO, O. J. Cultura de tecidos de explantes de café. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, Poços de Caldas. Resumos.v. 2, p. 299- 300, 1974.

CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e tatinos totais em barbatimão [stryphnodendron adstringens (mart.) coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2009.

CHENG, W.-H.; WANG, F.-L.; CHENG X.-Q.; ZHU, Q.-H.; SUN, Y.-Q.; ZHU, H.G.; SUN, J. Polyamine and its metabolite H₂O₂ play a key role in the conversion of embryonic callus into somatic embryos in upland cotton. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1063, 2015.

CUENCA, B.; SAN-JOS, M. C.; MARTINEZ, M.T.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. **Plant Cell Rep**, v. 18, p. 538–543, 1999.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 91-8, 2001.

DE JONG, A. J.; SCHMIDT, E. D. L.; DE VRIESS. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Mol Biol**, v. 22, p. 367–377, 1993.

DIAS, M. C. L. de L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A Rich) Stapf. pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 145-151, 2008.

DOS SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.3, p.571-577, 2003.

DOS SANTOS, N.; NUNES, C.; PASQUAL, M.; VALENTE; T. C.; OLIVEIRA, A. C. L. D.; SILVEIRA, N. M. Análise bioquímica de calos de pinhão- manso. **Ciência Rural**, v. 40, 2010.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Hallgren, J.E. (Ed). Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish. Proceedings. Swedish: **University of Agricultural Sciences**, v. 8, p. 147–186, 1988.

- FRANKENBERGER, J. R.; W. T.; ARSHAD, M. **Phytohormones in soils: microbial production and function.** Marcel Dekker, Inc. New York. 1995.
- FURTADO, M. B. **Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorifera* (Lauraceae).** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories.** British Library, Great Britain, 709p. 1984.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture.** Springer, Berlin, 3 ed., v. 1, p. 501. 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-260. 1999.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas.** In: Torres, A.c.; Caldas, L.S.; Buso, JA. Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas. Brasília, SPI/Embrapa, v. 2, p. 533-568, 1999.
- GUEDES, R. S. **Embriogênese Somática e regeneração de plantas de dendezeiro.** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2008.
- HUTCHINSON, M. J.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron: evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium. **J Plant Physiol**, v. 149, p. 573-579, 1996.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the action of thidiazuron hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.
- JORGE-NETO J. Pharmacognostic study of essential oil of sucupira, *Bowdichia virgilioides*. **Ver. Fac. Farm. Odontol.**, Araraquara, v. 4, p. 203-204, 1970.
- KARUPPUSAMY S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **J. Med. Plants. Res.**, v. 3 p. 1222– 1239, 2009.
- KUMAR, M. S.; CHAUDHURY, S.; BALACHANDRAN, S. *In Vitro* Callus Culture of *Heliotropium indicum* Linn. for Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, p. 2897-2909, 2014.
- LIMA J. E.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Callus, shoot and hairy root formation *in vitro* as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. **Plant Cell. Rep.**, v. 28, p. 1169-1177, 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Ed. Plantarium. p. 195, 1992.

- LOYOLA-VARGAS, V. M.; DE-LA-PEÑA, C.; GALAZ-AVALOS, R. M.; QUIROZ-FIGUEROA F. R. **Plant tissue culture**. An intemporal set of tools. Protein and Cell Biomethods Handbook. Totowa: Humana Press; p. 875–904, 2008.
- MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em Coffea Arabica L.** 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2001.
- MALÁ, J.; GEMPERLOVÁ, L.; CVIKROVÁ, M.; MÁCHOVÁ, P. Role of Polyamines in Efficiency of Norway Spruce (Hurst Ecotype) Somatic Embryogenesis. Rijeka: **INTECH Open Access Publisher**, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), p. 373-386, 2012.
- MARINHO, L. C.; CUNHA, M. T.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Constituents of Bowdichia virgilioides. **Fitoterapia**, v. 65, p. 475-6, 1994.
- MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regul.**, v. 34, p. 135–148, 2001.
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Anal. Chem.**, v. 22, p.1156–1158, 1950.
- MORCILLO, F.; GALLARD, A.; PILLOT, M.; JOUANNIC, S.; ABERLENC- BERTOSSI, F.; COLLIN M.; VERDEIL, J. L.; TREGEAR, J. W. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta [S.I.]**, v. 226, n. 6, p. 1353-1362, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- NOCEDA, C.; SALAJ, T.; PÉREZ, M.; VIEJO, M.; CAÑAL, M. J.; SALAJ, J. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of Pinus nigra Arn. **Cell Culture Trees**, v. 23, pag. 1285–1293, 2009.
- NOGUEIRA, R.C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, MG, 2006.
- OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Some Brazilian plants employed in diabetes treatment. **Braz. J. Pharmacol.**, v.4, p. 170-96, 1989.
- RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somaticembryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93– 107, 1995.
- ROSADO, L. D. S; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; BLANK, A. F.; BERTOLUCCI, S. Y. Aspectos do cultivo *in vitro* do manjeriço cv. Maria Bonita (Ocimum basilicum L.). **Plant Cell Culture Micropropagation**, v.5, p. 71-78, 2009.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M.G.R.; GUIMARÃES, M.C.M.; LIMA, R.A.; OLIVEIRA, C.L.L.G. Callogenesis in leaves of Kalanchoe pinnata Lam. by 2,4-D and BA action. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, p.760-764, 2014.

SCOTTON, D. C.; BENEDITO, V. A.; MOLFETTA, J. B.; RODRIGUES, I. B. F. P.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. **Hortic. Bras.**, v. 31, p. 80–85, 2013.

SERRA, A.G.P. et al. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 833-840, 2000.

SILVA, R. F. da; MENÉNDEZ-YUFFÁ, A. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. 'Catimor'. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.5, p. 250- 257, 2006.

SILVA, A. C. M.; SANTOS, M. P. A.; FRANÇA, S. A.; SILVA, V. C.; SILVA, L. E.; FIGUEIREDO, U. S., DALL'OGGIO, E. L., SOUSA JÚNIOR, P. T.; LOPES, C. F.; THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C.; VASCONCELLOS, C. L.; LIRA, F.; CAMBUI, E. V.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **J. Ethnopharmacol**, v.127, p. 451-456, 2010.

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004.

SOKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSIOU, M.; TEPE, B.; AKPULAT, A.; SAHIN, F.; SOKMEN, A. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3309-3312, 2004.

STEINER, N; VIEIRA, F.; MALDONADO, S; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v.48, p. 896-903, 2005.

TORRENEGRA, R.; BAUEREISS, P.; ACHENBACH, H.; Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*, **Phytochem.**, n. 28, p.2219-21. 1989.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1998.

ULANOV, A., WIDHOLM, J. M. Metabolic profiling to determine the cause of the increased triphenyltetrazolium chloride reduction in mannitol-treated maize callus. **Journal of plant physiology**, v. 167, p. 1423-1431, 2010.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, p. 592-597, 2012.

VONDRÁKOVÁ, Z.; ELIÁSOVÁ, K.; VÁGNER, M.; MARTINCOVÁ, O.; CVIKROVA, M. Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels

and the development of *Picea abies* somatic embryos. **Plant Growth Regul.**, v. 75, p. 405–414, 2015.

VERDEIL, J.-L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy? **Trends Plant Sci.**, v. 12, p. 245-252, 2007.

VELOZO L.S.; SILVA B.P.; SILVA B.E.; PARENTE J.P. Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 5, p. 532-535, 1999.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VOGEL, G. How does a single somatic cell become a whole plant? **Science**, v. 309, n. 5731, p. 86-86, 2005.

WARCHOL, M.; SKRZYPEK, E.; KUSIBAB, T.; DUBERT, F. Induction of somatic embryogenesis and biochemical characterization of *Cordyline australis* (G. Forst.) Endl. 'Red Star' callus. **Scientia Horticulturae**, v. 192, p. 338–345, 2015.

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

ZHANG CX, LI Q, KONG L. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 74, p. 201- 228, 2007.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411– 1423, 1993.