

MONALY SADO

Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2009

MONALY SADO

**Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna
spectabilis* (DC) Irwin et Barn
(Leguminosae) e seus compostos de reserva**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. EDISON PAULO CHU

Ficha catalográfica elaborada pela seção de biblioteca do Instituto de Botânica

Sado, Monaly

S125e Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn
(Leguminosae) e seus compostos de reserva / Monaly Sado -- São Paulo, 2009.
90 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2009

Bibliografia

1. Leguminosae. 2. Auxina. 3. Cultivo *in vitro*. I. Título

CDU: 582.736

À minha família, amigos e todas as
pessoas importantes que me
apoiaram durante esta jornada

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica pela oportunidade de estagiar, pela infra-estrutura e laboratórios e pelo material fornecido;

À CAPES pela bolsa concedida durante o tempo de realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente nas pessoas da Dra Sonia M. Campos Dietrich e Dra Solange C. Mazzoni-Viveiros pela compreensão e pela bolsa concedida. À Secretária Márcia Regina Ângelo pela compreensão e dedicação;

Ao Pesquisador Dr. Edison Paulo Chu, pela imensa paciência e dedicação, pelos conhecimentos e principalmente pela orientação;

Ao Pesquisador Dr. Armando Reis Tavares pelo carinho, dedicação, apoio e toda a ajuda que foi indispensável para a realização deste trabalho;

Ao Pesquisador Dr. Shoey Kanashiro pelo carinho, pela companhia e pela amizade;

Às Pesquisadoras Dra Rita de Cássia Leone Figueireido-Ribeiro, Dra. Márcia Regina Braga, Dra Luce Maria Brandão Torres pelas sugestões, pelo interesse e pelos ensinamentos;

Aos Pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica, Dra. Angela Maria Ladeira, Dr Emerson Alves da Silva, Dra Lilian Beatriz Penteado Zaidan, Dr. Marco Aurélio Silva Tiné, Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar, Dra Maria Angela M. de Carvalho, Dra Maria Claudia Marx Young, Dra Marília Gaspar Mais, por todo apoio, atenção e sugestões;

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas;

Ao aluno de pós-graduação Marcelo Silva por toda a ajuda, compreensão e paciência durante a realização das análises por CG-FID;

Aos meus Pais Ayami e Hiroshi, à minha irmã Stefanie e ao Eiji pelo apoio, pelo incentivo, compreensão, paciência, amor e carinho que foram importantes para a finalização deste trabalho;

Às minhas queridas amigas Ester, Jeniffer e Patrícia por todo o apoio, pelas correções de última hora, pelo carinho e principalmente pela amizade;

Aos alunos e estagiários da Seção de Fisiologia e Bioquímica pela tagarelice, atenção, carinho, bom humor e companheirismo;

Às amigas e alunas da Seção de Fisiologia e Bioquímica Vanessa Costa , Paola Mitie e Roberta pela amizade, pelas risadas, pela companhia e camaradagem durante a realização dos experimentos;

Aos meus queridos amigos internautas Heloisa e Neto que acompanharam meu sofrimento durante as madrugadas no computador;

Aos meus companheiros caninos que me receberam calorosamente todos os dias após o expediente;

À todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Símbolos e abreviaturas utilizadas

AIA	ácido indolacético
ANA	ácido naftaleno acético
CO ₂	dióxido de carbono
g	grama
L ⁻¹	por litro
M	molaridade
mg	miligrama
ms	massa seca
MS	Murashigue-Skoog
ns	não significativa (p>0,05)
PAR	photosynthetic assimilation rate (taxa de assimilação fotossintética)
2,4-D	ácido 2,4- diclorofenoxiacético
°C	graus Celsius
μM	micromol
μmol m ⁻² s ⁻¹	micromol por metro quadrado por segundo

Índice

1. Introdução	10
1.1. O gênero <i>Senna</i>	10
1.2. <i>Senna spectabilis</i>	11
1.3.1. Cultura de tecidos organizados	14
1.3.2. Cultura de tecidos desorganizados	15
1.4. Calogênese	16
1.5. Embriogênese	18
1.6. Meio de Cultura	19
1.7. Cultivo <i>in vitro</i>	20
1.8. Reguladores vegetais	23
1.8.1. Auxinas	23
1.9. Carboidratos	25
2. Objetivos.....	29
3. Material e métodos	29
3.1. Obtenção de material vegetal.....	30
3.2. Preparação do meio de cultura.....	31
3.3. Inoculação das sementes	33
3.4. Inoculação de explantes	33
3.5. Análises biométricas e preparo de amostras	34
3.6. Extração e determinação dos teores de carboidratos solúveis totais, proteínas solúveis e amido.....	34
3.7. Extração, purificação das amostras e preparo de padrão de espectralina.....	36
3.8. Análise por cromatografia a Gás-Líquido (CG-FID).....	36
3.9. Análises estatísticas	37
4. Resultados	38
4.1. Indução de calos por tratamento em função do explante.....	41
4.2. Indução dos diferentes tipos de calos por tratamento	43
4.3. Massa de matéria fresca e seca dos calos por tratamento	43
4.4. Carboidratos totais	45
4.5. Proteínas.....	47

4.6. Amido	48
4.7. Somatória dos compostos de reserva	49
4.8. Espectralina	51
5. Discussão	54
5.1. Formação de calos	54
5.2. Compostos de reserva	56
5.3. Carboidratos solúveis totais	56
5.4. Proteínas Solúveis	57
5.5. Amido	58
5.6. Somatória dos compostos de reserva analisados	59
5.7. Espectralina	60
6. Considerações Finais	61
7. Conclusões	62
8. Resumo	63
9. Abstract	65
10. Referências Bibliográficas	67
Anexos.....	75
Anexo 1	75
Anexo 2	76
Anexo 3	77
Anexo 4	78
Anexo 5	79
Anexo 6	80
Anexo 7	81
Anexo 8	82
Anexo 9	83
Anexo 10	84
Anexo 11	85
Anexo 12	86
Anexo 13	87
Anexo 14	88

1. Introdução

1.1. O gênero *Senna*

O gênero *Senna* compreende aproximadamente 350 espécies distribuídas pelo mundo, incluindo arbustos, árvores, ervas e cipós, colonizando com sucesso uma ampla gama de habitats em diferentes climas e latitudes (Viegas *et al.* 2004; Marazzi *et al.* 2006). Cerca de 80% das espécies ocorrem no continente americano e, aproximadamente 60 são encontradas no Brasil (Irwin & Barneby 1982; Randell & Barlow 1998). Na África e na Ásia, diversas espécies do gênero são utilizadas no tratamento de doenças como alternativas aos medicamentos alopáticos (Samy *et al.* 1998; Samy & Ignacimuthu 2000).

Recentes revisões na classificação botânica dos gêneros *Senna* e *Cassia* levaram à transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o gênero *Senna*. Com a separação das leguminosas nas subfamílias Caesalpiniaceae, Mimosaceae e Papilionaceae, o gênero *Senna* agora está incluído no grupo Caesalpiniaceae (Fabaceae), e na subtribo Cassiinae, juntamente com *Cassia* e *Chamaecrista*. Alguns estudos filogenéticos apontam que *Senna* é monofilético, entretanto o mesmo gênero pode ser agrupado com *Cassia* (Marazzi *et al.* 2006; Bruneau *et al.* 2001) ou *Chamaecrista* (Herendeen *et al.* 2003)

Atualmente, diversas espécies do gênero *Senna* estão sendo estudadas e relatadas como fontes ricas em derivados fenólicos, antracênicos e antraquinônicos. *Cassia torosa* cav., nativa do Japão, é utilizada pela população no tratamento de picadas de insetos, como tônico, digestivo e antídoto. Estudo fitoquímico realizado com sementes e raízes desta espécie revelou a presença de flavonóides, antracenos e antraquinonas posteriormente comprovados como os responsáveis pelas atividades medicinais mencionadas (Kitanaka & Takido 1994). Extratos de *Cassia fistula* Schimp. ex Oliv., espécie com grande potencial medicinal e intensamente cultivada na Índia e China, são popularmente utilizados como agente antiofídico e no tratamento de infecções. Estudos laboratoriais comprovaram que essas espécies apresentam potencial bactericida

significativo contra bactérias gram-negativas (Samy & Ignacimuthu 2000; Asseleih *et al.* 1990).

As espécies brasileiras de *Senna* e *Cassia* apresentam, em sua maioria, alcalóides piperidínicos como constituintes majoritários, indicando sua importância em estudos para a produção de novos fármacos. Tais alcalóides apresentam propriedades tóxicas e farmacológicas de particular interesse demonstradas em ensaios realizados com extratos e com as substâncias purificadas dessas espécies (Viegas *et al.* 2006).

Estudos recentes propõem que alcalóides piperidínicos do gênero *Senna* são os responsáveis pelas propriedades farmacológicas das plantas deste gênero, como atividades antiinflamatórias, analgésica periférica, laxativa, anestésica, antimicrobial, inibitória de atividade superóxido (Viegas *et al.* 2004; Viegas *et al.* 2006) e, principalmente, como inibidores da acetilcolinesterase, sugerindo um potencial tratamento para a doença de Alzheimer pois a acetilcolinesterase impede a passagem do estímulo entre os neurônios prejudicando o funcionamento correto do cérebro, em especial no compartimento da memória (Bolzani *et al.* 1995; Moreira *et al.* 2003). A espécie *Senna spectabilis*, considerada como espécie rica em alcalóides piperidínicos, é vista como uma planta com potencial farmacológico e diversos estudos estão sendo realizados para elucidar os compostos bioativos e sua utilização medicinal.

1.2. *Senna spectabilis*

Senna spectabilis (sin *Cassia spectabilis*) (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) (figura 1), popularmente conhecida como cássia carnaval, é uma planta decídua, heliófita, xerófita seletiva e nativa das Américas Central e do Sul, sendo encontrada principalmente nos cerrados e caatinga do nordeste do Brasil (Braga 1982). É uma árvore de crescimento rápido atingindo de 6 a 9 metros de altura e 30-40 cm de diâmetro (Garrity & Mercado 1994; Lorenzi 1998), apresentando uma orla de densas folhas com dossel simétrico (Gilman & Watson 1994).



Figura 1. Copa de árvore adulta de *Senna spectabilis*. Foto: Alessandro Gruetzmacher, 2009

A espécie apresenta folhas compostas pinadas, com 10-20 pares de folíolos de 2-4 cm de comprimento, de formato oblongo e simetria alternada. Sua madeira é considerada moderadamente pesada, mole e pouco compacta, com durabilidade média se protegida da umidade. A utilização comercial da espécie é indicada na confecção de caixotes de madeira, produção de carvão e brinquedos. Floresce amplamente durante todo o verão (dezembro-abril) e produz flores de cor amarela, conferindo à árvore aparência exuberante. A frutificação ocorre de agosto a setembro, sendo do tipo vagem (figura 2) com 10 a 20 cm de comprimento e contém numerosas sementes (Lorenzi 1998). As vagens são delgadas e levemente moles quando verdes, tornando-se mais rígidas à medida que vão amadurecendo (Gilman & Watson 1994).



Figura 2. Fruto de *S. spectabilis* retirado do espécime do IBt (barra = 1,0cm).

A *Senna spectabilis*, por seu efeito ornamental, pode ser utilizada para paisagismo sendo muito empregada para arborização urbana, podendo ser também destinada à recomposição de áreas degradadas e indicada para áreas de preservação permanente. Apesar de ser uma espécie rústica, capaz de crescer em solos ácidos e inférteis (Maclean *et al.* 1992), Jeller & Perez (2001) constataram que suas sementes são pouco resistentes à seca e a salinidade. Seu desenvolvimento é favorável em solos levemente alcalinos compostos preferencialmente por argila, barro e areia (Gilman & Watson 1994).

De acordo com Viegas *et al.* (2004), a medicina popular se beneficia das atividades citotóxicas e tóxicas da planta. Os autores listaram os bioensaios realizados com extratos vegetais de *S. spectabilis* e revelaram atividade analgésica, antiinflamatória e inibitória de superóxido. Sangetha *et al.* (2009) demonstraram a capacidade citotóxica de extratos metanólicos da espécie em células de *Candida albicans* (Berkhout), fungo conhecido por atacar indivíduos imunodeficientes provocando infecções nas mucosas. O tratamento com extrato de *Senna spectabilis* (6,25 mg.ml⁻¹) por 36 h foi o que apresentou melhores resultados contra o fungo, e observaram através do microscópio eletrônico de transmissão e de varredura que as células deste fungo estavam rompidas após aplicação do tratamento com o extrato, demonstrando atividade citotóxica da planta. Chukeatirote *et al.* (2007) constataram que extratos aquosos brutos de *S. spectabilis* apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, bactéria causadora de infecções alimentares.

Kamo *et al.* (2003) investigaram a ação de extratos metanólicos de espécie africana de *S. spectabilis* em macrófagos e constataram ação inibitória na produção de ânion superóxido (íons envolvidos no sistema antioxidante de plantas e animais e relacionados à inflamação, câncer e hipertensão).

Além de bioensaios, outros estudos buscaram isolar e identificar as substâncias de interesse farmacológico. Bolzani *et al.* (1995) realizaram um estudo pioneiro da atividade de alcalóides piperidínicos isolados das folhas de *S. spectabilis* no reparo de DNA de linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen. Dos alcalóides isolados, três apresentaram atividade citotóxica seletiva inibindo o desenvolvimento das células do fungo que apresentavam mutação. Vários alcalóides presentes na espécie foram isolados em diversos trabalhos realizados independentemente, a fim de identificar atividades biológicas relevantes (Viegas *et al.* 2006). Segundo Viegas *et al.* (2003) a espectralina, alcalóide isolado das flores da planta, apresentou atividade analgésica periférica, em bioensaios *in vivo*, apesar de sua toxidez.

O trabalho de etnofarmacologia realizado por Viegas *et al.* (2006) aponta *Senna spectabilis* como rica em alcalóides piperidínicos e os classifica como de grande interesse farmacológico, motivando grupos de pesquisa a desenvolverem metodologias que possibilitem a obtenção de alcalóides em quantidades superiores às aquelas produzidas pelas fontes naturais.

Pivatto *et al.* (2005) confirmaram a presença de alcalóides piperidínicos nos extratos etanólicos de *S. spectabilis*, apresentando também propriedades anticolinérgicas e indicou a necessidade de investigação da biossíntese, da presença de outros alcalóides e principalmente se calos induzidos por *in vitro* seriam capazes de sintetizar esta classe de alcalóides, possibilitando o desenvolvimento de uma promissora técnica biotecnológica de produção destes compostos secundários de grande interesse farmacológico.

1.3.1. Cultura de tecidos organizados

Os tecidos organizados podem ser definidos como tecidos formados por células diferenciadas e organizadas entre si, constituindo um órgão vegetal (Raven *et al.* 2001).

A cultura de tecidos organizados é utilizada como um termo geral para tipos de cultura em que uma forma organizada de crescimento pode ser mantida continuamente. Ou seja, é preciso isolar assepticamente plantas inteiras ou que apresentem primórdios de gemas foliares, flores e frutos imaturos (Loyola-Vargas & Vásquez-Flota 2006).

Os principais tipos de culturas de órgãos são: (a) meristemática: em que são cultivados pequenos ápices caulinares, consistindo do domo apical meristemático com ou sem um ou dois primórdios foliares; o ápice da plântula geralmente gera apenas um broto; (b) cultura de brotos: iniciada a partir de ápices de plântulas; onde são utilizados explantes um pouco maiores do que os presentes na cultura de meristema e que apresentem diversos primórdios foliares, cultivadas de modo que cada gema desenvolva brotos múltiplos; (c) cultura de nódulos onde gemas laterais são separadas, cada uma presente em um pequeno pedaço do caule; pedaços de caule contendo uma única ou diversas gemas podem ser cultivados e cada broto é cultivado para fornecerem uma única plântula; (d) culturas isoladas de raiz onde as mesmas crescem isoladamente, sem conexão com a parte aérea, podendo-se obter um sistema ramificado de raízes; e (e) cultura de embriões onde embriões zigóticos fertilizados ou não fertilizados são dissecados da semente em desenvolvimento ou de frutos, e cultivados *in vitro* até se desenvolverem em mudas (George *et al.* 2008).

1.3.2. Cultura de tecidos desorganizados

Tecidos desorganizados são constituídos por milhares de células não diferenciadas e também de crescimento desorganizado, sem a formação de uma estrutura ou órgão vegetal (Raven *et al.* 2001).

O crescimento de plantas vasculares depende da atribuição de funções organizadas em órgãos que, em consequência, tornam-se diferenciados, ou seja, modificados e especializados para que possam exercer as suas funções essenciais. O crescimento desorganizado não é comum no ambiente natural, entretanto ocorre com frequência quando fragmentos de plantas superiores são cultivados *in vitro*. Dentre estes podemos destacar cultura de calos com crescimento e manutenção de grandes massas celulares, decorrentes do crescimento desordenado de fragmentos de tecido vegetal,

órgãos de plantas ou proveniente de culturas prévias; culturas em suspensão, com uma população de células vegetais e pequenos aglomerados de células dispersos em meio líquido em agitação; cultura de protoplastos com células vegetais sem parede celular; e cultura de anteras inteiras contendo micrósporos de pólen imaturos (Pierik 1987; George *et al.* 2008).

O objetivo da cultura de anteras inteiras é a obtenção de plantas haplóides pela formação de embriões somáticos a partir do pólen. Sua aplicação em programas de melhoramento de culturas é de grande importância agrônômica, uma vez que permite a realização rápida de homozigose genética, que é de primordial importância na produção de linhagens e novos cultivares (Konieczny *et al.* 2003).

1.4. Calogênese

Geralmente a formação de calos é induzida a partir de um ferimento em uma planta intacta, causado pela ação de insetos, microorganismos ou como resultado de estresse físico ou fisiológico (George *et al.* 2008).

No contexto da cultura de tecidos, o termo calo é utilizado para denominar um tecido amorfo não organizado, formado por células que se multiplicam desordenadamente (Godoy-Hernández & Vasquéz-Flota 2006).

A indução do calo pode ocorrer inoculando-se explantes de qualquer parte da planta em meio de cultura e, com o estímulo de reguladores de crescimento endógenos ou com adição de produtos químicos que induzem o crescimento, modificando o metabolismo celular de quiescente para ativo. Neste processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante dá início a um novo tecido composto por células meristemáticas não especializadas. Durante a dediferenciação os produtos de reserva tendem a desaparecer, novos meristemas são formados no tecido e estes dão início à formação de células parenquimatosas não diferenciadas e sem qualquer ordem estrutural antes presente no explante dos quais derivaram. Embora o calo continue desorganizado durante a multiplicação celular, alguns tipos de células especializadas

podem ser formados ao acaso por meio de centros de morfogênese. Essas células especializadas são capazes de iniciar a formação de órgãos como raízes, brotos e embriões somáticos (George *et al.* 2008).

Embora a maioria dos experimentos seja conduzida utilizando explantes de plantas superiores, a calogênese também ocorre em gimnospermas, algas e pteridófitas (George *et al.* 2008). Muitas partes da planta possuem potencial para se desdiferenciarem formando calos, entretanto a cultura de calos é mais facilmente estabelecida a partir de determinados órgãos em relação a outros. Tecidos jovens meristemáticos são os mais indicados, mas é possível obter calogênese a partir de fragmentos já diferenciados (Loyola-Vargas & Vazquez-Flota 2006; George *et al.* 2008).

O calo formado no explante original é denominado calo primário. O calo secundário é originado a partir de pedaços dissecados do calo primário e, com subculturas, a multiplicação pode ser estendida por muitos anos. Contudo, quanto mais tempo a cultura de calos é mantida, maiores são as chances das células sofrerem mudanças genéticas (George *et al.* 2008).

Durante a subcultura de calos, é possível observar cinco fases de crescimento:

- fase de espera: onde as células estão se preparando para dividir;
- fase exponencial: em que a taxa de divisão celular atinge o clímax;
- fase linear: onde a divisão celular decresce, mas a expansão celular aumenta;
- fase de desaceleração: quando a taxa de divisão e expansão celular diminuem; e
- fase estacionária: quando o número e tamanho das células permanecem constantes (Phillips *et al.* 1995).

Os calos podem ser classificados de acordo com as formas e as cores que apresentem. Um único explante pode gerar diferentes tipos de calos denominados como:

- (a) Calo Friável: tecido formado por células sobrepostas que, ao toque, se desagregam em células ou grupos de células (Godóy-Hernández & Vazquez-Flota 2006);

- (b) Calo nodular: tecido celular formado por células agregadas, levemente resistentes ao toque, apresentando nódulos globulares com aspecto aveludado em sua superfície; estes, de acordo com Gamborg & Phillips (1995) e Jiménez (2001), são denominadas como somáticos imaturos, um tecido não-embriogênico o qual após a fase de diferenciação, gemas, folhas ou raízes são formadas, diferindo de tecidos pré-embriogênicos que se diferenciam em embriões somáticos;
- (c) Calo compacto: massa celular com aspecto aveludado formada primariamente a partir do explante inicial, composto por células compactadas entre si, formando um tecido resistente ao corte ou fragmentação (George *et al.* 2008);
- (d) Calo oxidado: tecido já velho geralmente de origem friável, com coloração marrom, sem capacidade para continuar se reproduzindo, estando em fase de senescência (George *et al.* 2008)

1.5. Embriogênese

Na natureza, o principal ciclo de reprodução das plantas consiste no desenvolvimento dos embriões zigóticos (Mikula *et al.* 2005). Sua formação começa com a divisão do óvulo fecundado – o zigoto – seguida da diferenciação do embrião (Mikula *et al.* 2005). Como alternativa, as plantas podem diferenciar células somáticas individuais ou grupos delas para formar embriões completos sem a fusão de gametas, processo chamado de embriogênese somática (Jiménez 2001; Iantcheva *et al.* 2005). Em condições naturais este processo ocorre de forma limitada, dentro de óvulos (*Paeonia*) e mais raramente em folhas (*Kalanchoe*) (George *et al.* 2008).

Embora os embriões somáticos possuam aspectos morfológicos análogos aos dos zigóticos, seu desenvolvimento ocorre por meios distintos. A estrutura bipolar do embrião somático contém meristemas tanto da raiz como da parte aérea (Phillips *et al.* 1995; Stasolla 2006) e evolui através de etapas estruturais distintas: globular, forma de

coração, torpedo, cotiledonar e estágio de maturação, conforme o embrião se desenvolve (Phillips *et al.* 1995).

A embriogênese somática pode ser dividida em dois tipos: direta e indireta. Durante a embriogênese direta, explantes cultivados em meio de cultura inicial formarão unidades embriogênicas que se desenvolverão diretamente em embriões bipolares. No processo de embriogênese indireta, as primeiras unidades embriogênicas não se desenvolvem além do estágio pré-globular, mas se dividem em novas unidades. Em algumas espécies, é possível induzir os dois tipos de embriogênese dependendo da escolha do explante ou com o uso apropriado do regulador vegetal, enquanto em outras espécies só é possível induzir apenas um dos dois tipos (Raemakers *et al.* 2006).

A embriogênese somática é empregada para a propagação vegetativa de muitas espécies, embora seja um processo em constante aperfeiçoamento (Mikula *et al.* 2005). A técnica proporciona resultados mais rápidos, pois a indução é feita diretamente a partir do explante, o procedimento é mais simples e pode-se obter grande multiplicação de propágulos completos, com raízes e brotos (George *et al.* 2008). Ao contrário de brotos, os embriões somáticos se originam de células individuais e as culturas embriogênicas podem ser sincronizadas e purificadas para obtenção de material homogêneo (Jiménez 2001).

Embora o processo de maturação, germinação de embriões somáticos e eficiente formação de plântulas ainda sejam sérias limitações para a exploração prática da técnica de embriogênese somática, o processo apresenta alto potencial para a propagação em grande escala com boas perspectivas comerciais. A formação de embriões somáticos é uma técnica de regeneração *in vitro* incomparável e oferece muitas vantagens, incluindo o potencial para a produção ilimitada de clones com características de elite além de ser especialmente valiosa, por manter uma fonte de protoplastos regenerável (Anjaneyulu & Giri 2008; Aslam *et al.* 2008).

1.6. Meio de Cultura

O meio de cultura no qual os explantes são cultivados é composto de sais inorgânicos, fonte de nitrogênio, carbono e vitaminas. Outros componentes podem ser

adicionados para fins específicos, como por exemplo, os reguladores vegetais, agentes de gelificação, compostos nitrogenados orgânicos, ácidos orgânicos e extratos vegetais (Gamborg 1968).

Foram desenvolvidas diversas composições de sais para meios de cultura, no entanto, a composição estabelecida por Murashige e Skoog (1962) (MS) foi considerada a mais utilizada para procedimentos onde o objetivo é a regeneração de plantas do grupo das dicotiledôneas (Gamborg & Philips 1995).

A quantidade de sais necessária na preparação do meio para cultura de tecidos vegetais é relativamente pequena. Na maioria dos casos os sais de amônio podem ser usados entre 2-20 mM e concentrações de 1 a 3 mM de sais de cálcio, sulfato, fosfato e magnésio são suficientes para o desenvolvimento dos explantes. No meio de cultura estabelecido por Murashige e Skoog (1962) são adicionados os macronutrientes KNO₃, NH₄NO₃, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄; e os micronutrientes: H₃BO₃, MnSO₄, ZnSO₄, Na₂MoO₄, CuSO₄, CoCl₂, KI, essenciais para o correto desenvolvimento da plântula. Sacarose, glicose ou frutose são as únicas fontes de carbono disponíveis que irão auxiliar o crescimento das células vegetais. As plantas sintetizam todas as vitaminas necessárias para seu crescimento, mas as culturas celulares demonstram a necessidade de tiamina e outras vitaminas que podem aumentar o seu crescimento e diferenciação. As vitaminas utilizadas no meio MS são ácido nicotínico, tiamina, piridoxina e mio-inositol, necessárias para fornecer co-fatores para a produção de proteínas (Philips *et al.* 1995). Uma fonte de ferro é necessária e geralmente utiliza-se o ferro em sua forma quelada (Fe-EDTA) para evitar a precipitação (Franklin & Dixon 1994).

Avaliar e conhecer as exigências nutricionais e as necessidades metabólicas das células e tecidos de cada espécie a ser cultivadas são de suma importância para a escolha do tipo de meio de cultura a ser utilizado. Em geral, a escolha do meio de cultura é ditada pelo propósito da cultura de tecido de acordo com as necessidades de cada espécie maximizando o desenvolvimento do vegetal ou pode ser adequado às necessidades da pesquisa em questão (Gamborg & Philips 1995).

1.7. Cultivo *in vitro*

As células vegetais, com o estímulo correto, podem se multiplicar e diferenciar para uma função específica. Esse poder de regeneração é conhecido como capacidade totipotente (Brown & Charlwood 1986). A partir desse conceito de totipotencialidade celular desenvolveu-se a cultura de tecidos. As primeiras tentativas realizadas por Haberlandt em 1902 fracassaram, entretanto, em 1939, Nobécourt *et al.* foram os primeiros a obterem resultados positivos no desenvolvimento de cultura de tecido vegetal *in vitro* (Pierik 1987).

A cultura de tecidos é definida como o conjunto de técnicas capazes de desenvolver células, tecidos ou órgãos vegetais utilizando soluções nutrientes em um ambiente asséptico e controlado, isolados da planta-mãe. Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram em uma planta inteira. Desde o início dos anos 60 até a metade dos anos 80, a cultura de tecidos se transformou em um sistema básico para a biotecnologia moderna e estruturas para o cultivo *in vitro* podem ser encontradas em quase todos os laboratórios de fisiologia vegetal. O uso das técnicas de cultura permite reduzir o tempo de produção de cultivares, auxilia no melhoramento genético convencional e pode ser considerada uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas de interesse comercial ou farmacológico.

O grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos é dependente da escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota 2006).

Existem diversos tipos de cultura, dependendo do material com que se inicia o experimento. É possível cultivar plantas inserindo a semente diretamente sobre o meio de cultura, ou pode-se clonar a planta a partir de órgão retirado da planta-mãe. Neste caso retira-se a gema, folha, caule ou raiz e inocula-se diretamente sobre o meio de cultura esperando-se a diferenciação do tecido isolado (Pierik 1987).

As plantas, em função de sua natureza sésil e, em algumas espécies, longa expectativa de vida, desenvolveram maior capacidade de resistir a condições extremas e

à predação. Muitos dos processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal são adaptados ao meio ambiente e esta plasticidade permite que as plantas alterem seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento para sobrevivência no ambiente. Um aspecto importante dessas capacidades adaptativas dos vegetais é a competência de iniciar divisão celular a partir de qualquer tecido e regenerar órgãos perdidos ou mesmo poder se diferenciar em qualquer célula especializada como resposta a um determinado estímulo, tornando-as ideais para o processo de cultivo *in vitro* (Huey *et al.* 2003).

O uso da técnica de cultivo *in vitro*, possibilita a produção em grande quantidade de mudas de variedades selecionadas a partir de um baixo número de explantes (Willadino *et al.* 2001). Para incrementar a produção, melhorar a qualidade e facilitar a colheita utiliza-se reguladores de crescimento, naturais ou sintéticos, que podem ser aplicadas diretamente nos meios de cultura para alterar os processos vitais e estruturais da planta cultivada (Laca-Buendia 1989). Entre os reguladores mais conhecidos estão auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico.

A cultura de tecidos é amplamente utilizada na multiplicação de plantas ornamentais de difícil reprodução ou em perigo de extinção, como as orquídeas. Shimura & Koda (2004) obtiveram sucesso no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Rebunatumorisou) Miyabe & Kudo, orquídea nativa do Japão em risco de extinção devido ao desmatamento e comércio ilegal de plantas retiradas das florestas, com o uso de sementes maduras e a aplicação de ácido naftaleno-acético (ANA) e 6-benziladenina (BA), os autores demonstraram a possibilidade de evitar a extinção da espécie e ainda desenvolver plantas que poderão ser comercializadas. Chen *et al.* (2005) conseguiram o mesmo resultado utilizando sementes imaturas de *Cymbidium faberi* (Orchidaceae) Rolfe, espécie ornamental da China muito comercializada, com aplicação de 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 2,0 - 5,0 mg L⁻¹ de BA.

A mesma técnica também é muito utilizada para a reprodução em massa de espécies nativas com potencial econômico, evitando assim o extrativismo exagerado, como no caso do ginseng americano (*Panax quinquefolius* L.) cujos explantes retirados de plântulas foram induzidos à embriogênese somática inoculando em meio de cultura contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D a 1,0 mgL⁻¹) e ANA (1,0 mgL⁻¹) (Zhou & Brown 2006).

1.8. Reguladores vegetais

Os reguladores vegetais são definidos como substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas diretamente nos meios de cultura para alterar seus processos vitais e estruturais (Laca-Buendia 1989). Oliveira *et al.* (1994) relataram que os reguladores de crescimento são essenciais para a produção de calos a partir de anteras de flores de feijão, importantes para o melhoramento genético sendo as auxinas 2,4-D (ácido 2,4–diclorofenoxiacético) e ANA mais favoráveis à produção de calos.

1.8.1. Auxinas

A auxina foi o primeiro hormônio vegetal a ser descoberto e isolado, sendo o mais compreendido, o mais importante e, sem dúvida, o mais notável (George *et al.* 2008). De origem grega, a palavra auxina significa “crescer ou aumentar”. A auxina controla processos básicos como a divisão e crescimento celular, portanto está diretamente envolvida com a formação de meristemas, originando tecidos não-organizados ou órgãos. Em tecidos organizados está envolvida no estabelecimento e manutenção da polaridade e na planta inteira seu efeito mais reconhecido é a manutenção da dominância apical e mediação dos tropismos (George *et al.* 2008; Raven *et al.* 2001). O ácido indolacético (AIA) é a auxina natural mais abundante, tendo sido descoberto em 1928 por Went que analisou o alongamento de células inferiores de coleóptilos de aveia e a substância transportada de seu ápice (Osborne & McManus 2005).

As vias de produção da auxina endógena em plantas ainda estão sendo estudadas. O triptofano foi inicialmente sugerido como precursor do AIA devido as suas semelhanças estruturais, tanto o triptofano quanto o AIA têm estrutura baseada no indol, e algumas evidências indicam que as plantas podem produzir AIA diretamente do triptofano (Raven *et al.* 2001; Osborne & McManus 2005). De acordo com Benjamins

& Scheres (2008) existem duas vias de biossíntese de auxina, uma, dependente do precursor triptofano (Trp) e outra Trp-independente. O citocromo P₄₅₀ pode converter Trp em indol-3-acetaldoxima (IAOx), um intermediário do AIA; esse citocromo é expresso em folhas jovens e flores, órgãos já confirmados como sítios de biossíntese de auxinas. Outros sítios de biossínteses como meristemas, tecidos vasculares e órgãos reprodutivos expressam o gene YUCCA, que está envolvido na síntese de auxina dependente de Trp.

O movimento das auxinas nos ramos e raízes do vegetal é lento e o transporte é polar, de célula a célula através de um sistema especializado, sempre na direção dos caules para as folhas e na direção do ápice para as raízes; em tecidos com suprimento vascular, o transporte de auxina é acrescido à conexão do xilema e floema (Raven *et al.* 2001). Podem ser armazenadas em células e tecidos em formas inativas como conjugados de aminoácidos e ésteres de açúcar (Osborne & McManus 2005). A sua utilização é muito comum na horticultura visto que são capazes de induzir a formação de raízes adventícias, têm efeito herbicida em função de sua concentração e podem promover o crescimento de frutos (Raven *et al.* 2001).

Na cultura de tecidos vegetais as auxinas são largamente utilizadas, sendo geralmente introduzidas ao meio junto com os demais nutrientes necessários ao cultivo. Promovem, sobretudo em conjunto com citocininas, o crescimento de calos, suspensões celulares e órgãos, regulando e direcionando a morfogênese. A escolha e a concentração administrada de auxinas dependem: (a) do tipo de crescimento e do desenvolvimento desejado; (b) da taxa de captação e de transporte da auxina aplicada ao alvo em questão; (c) da inativação (oxidação ou conjugação) da auxina do meio de cultura e do explante; (d) dos níveis naturais e da síntese endógena dentro do explante; (e) da sensibilidade do tecido vegetal à auxina (e outros reguladores também); e (f) da interação entre as auxinas aplicadas e as substâncias endógenas naturais (George *et al.* 2008).

As auxinas são reguladores vegetais muito requisitados para a indução de calos a partir de explantes, pois possuem a capacidade de alterar a fisiologia geneticamente programada de tecidos vegetais já diferenciados; células que respondem às auxinas são revertidas para o estado desdiferenciado e começam a se dividir (George *et al.* 2008). A mais utilizada para iniciar uma cultura de calos é o 2,4-D, embora alguns pesquisadores dêem preferência ao AIA e ANA para evitar variações genéticas e outros efeitos, como

observados nos experimentos realizados por Hildebrant *et al.* (1963) em que houve redução da formação de clorofila na presença de 2,4-D em culturas de tomate, ervilha e batata.

O processo de embriogênese somática é geralmente iniciado em meios de cultura contendo altas concentrações de auxina (especialmente 2,4-D), mas os embriões não se desenvolvem até que a concentração de auxina seja diminuída. Sharp *et al.* (1980) propuseram que as auxinas induzem a determinação embriogênica em um grupo de células mas ao mesmo tempo pausa o desenvolvimento dos centros de embriogênese que induziu; e George *et al.* (2008) sugerem que a divisão de células pré-embriogênicas e seu desenvolvimento em embriões só é retomada em baixas concentrações de auxinas.

As auxinas mais utilizadas no enraizamento são o ácido indol-butílico (AIB), o ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o fitormônio ácido indolacético (AIA) (Krikorian *et al.* 1988; Krieken *et al.* 1997). Em altas concentrações, elas geralmente induzem a formação de embriões somáticos, e em médias e baixas concentrações (0,01 – 5,0 mg L⁻¹) conduzem a calos e rizogênese (Finer 1994; George 1996).

O meio de cultura preparado para induzir embriogênese somática de soja, contém os macronutrientes e micronutrientes do meio MS, complexo de vitamina B5 (Gamborg *et al.* 1968), ferro-EDTA, 6% de sacarose, gelificado com agar ou phytigel e acrescido com 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para *Senna spectabilis*, adotou-se uma ampla faixa de concentração desta auxina, de 0,12 a 40 mg L⁻¹ de 2,4-D, com vistas à indução de calos e à indução e crescimento de raízes, além da embriogênese somática nas altas concentrações (Finner 1995).

1.9. Carboidratos

Os carboidratos são moléculas orgânicas abundantes na natureza e primariamente utilizadas como fonte de energia celular na maioria dos organismos vivos, bem como componentes importantes na formação de uma variedade de estruturas celulares e são formados por pequenas subunidades de açúcares classificadas de acordo com a quantidade de carbono como os monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos.

Possuem papel importante no metabolismo vegetal, atuando como substrato para o crescimento, regulação da morfogênese e diferenciação celular dos tecidos vegetais. Ademais de síntese de moléculas para translocação em vegetais, armazenamento e a formação de um esqueleto carbônico para a produção de moléculas orgânicas, os carboidratos também são necessários para manter a integridade da membrana citoplasmática como agente osmótico (Raven *et al.* 2001).

A partir da ferredoxina reduzida, conduz-se a assimilação fotossintética do carbono no cloroplasto, que produz fosfatos de açúcar como produto líquido. Estes podem ser utilizados para a formação de amido nos cloroplastos ou exportados para o citossol para a síntese de sacarose. A síntese de amido e sacarose está intimamente relacionada à taxa de assimilação de CO₂ através da troca de triose fosfato e fosfato inorgânico realizada pela membrana do cloroplasto (Foyer *et al.* 2000).

O amido e a sacarose são considerados reserva de carbono orgânico (Avigad 1982). A sacarose, um dissacarídeo composto de glicose e frutose, é particularmente importante uma vez que é a forma de carbono mais utilizada na exportação e importação de energia em plantas superiores. É largamente utilizada no meio de cultura *in vitro*, servindo como componente do esqueleto de carbono e fonte de energia.

O amido é armazenado nos plastos e é considerado um carboidrato de reserva temporário utilizado por diversas plantas superiores, enquanto a sacarose encontra-se no citossol das células do mesófilo das folhas, sendo acumulada por curtos períodos nos vacúolos (Foyer *et al.* 2000). Existe ainda o amido de transição que é sintetizado nos cloroplastos de plantas vasculares tanto para evitar o excesso de carbono recentemente assimilado e como reserva para os períodos de escuro quando a fotossíntese é impossibilitada (Raven *et al.* 2001). O amido é encontrado no cloroplasto como grânulos insolúveis consistido de dois tipos de polímeros de glicose: amilopectina e amilose. As vias de síntese estão bem definidas e envolve a ação da fosfoglucomutase, ADP glicose fosforilase, amido sintases e enzimas de ramificação. Os produtos da degradação do amido podem ser transportados do cloroplasto como açúcares ou como trioses fosfatos (Foyer *et al.* 2000).

A presença de carboidratos no meio de cultura é fundamental para o desenvolvimento regular dos explantes. Na cultura de tecidos indução da formação de raízes adventícias não é estabelecida com facilidade para diversas plantas lenhosas, a

indução e crescimento das mesmas são processos que requerem muita energia e somente ocorrem na presença de substratos metabólicos a disposição, majoritariamente os carboidratos. A qualidade dos tecidos cultivados *in vitro* é um fator importante para o sucesso durante a transição para o meio *ex vitro* (Custódio *et al.* 2004).

Os níveis de açúcares solúveis e amido nas células vegetais podem variar bastante em função do ambiente em que estão. De acordo com Grospietsch *et al.* (2000), segmentos internodais de epicótilos de *Solanum tuberosum* (L) cv. Klára, pré-tratados com o retardador de crescimento paclobutrazol (PBZ), muito utilizado para promover a regeneração *de novo* em organogênese, apresentaram maior acúmulo de amido (15,2 mg g⁻¹ MF) que o controle (sem o pré-tratamento) que acumularam maior quantidade de açúcares solúveis (22 mg g⁻¹ MF). Elavumoottil *et al.* (2003) aferiram a quantidade de sacarose e açúcares redutores e proteínas solúveis em calos de *Brassica oleracea* tolerantes ao estresse salinidade, observando acréscimo na concentração de sacarose e açúcares redutores, embora tenha ocorrido uma diminuição dos açúcares totais no final da terceira semana do período de crescimento em relação à primeira semana. Os autores sugeriram que o acúmulo de açúcar poderia ter contribuído para o balanço osmótico celular, prevenindo a desidratação e fornecido energia necessária, sob condições de salinidade, para abastecer um metabolismo celular mais ativo.

Catarina *et al.* (2003) visando à análise bioquímica dos embriões somáticos da espécie lenhosa *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), cultivados em Woody Plant Medium (WPM) acrescido de 22,7 g L⁻¹ de sorbitol, 2,0 g L⁻¹ Phytagel, 20,0 g L⁻¹ sacarose e 400 mg L⁻¹ de glutamina em diferentes estágios de desenvolvimento, constataram que embrióides em estágios globulares acumularam os maiores níveis de proteínas totais, enquanto aqueles em estágio cotiledonar e de maturação apresentaram altos níveis de açúcar solúveis e amido, demonstrando que existem diferenças significativas nos perfis de armazenamento de reservas acumuladas em diferentes estágios de desenvolvimentos dos embriões.

Os pontos de controle no ciclo celular podem ser estimulados ou inibidos por substâncias de crescimento vegetal (hormônios e reguladores de crescimento). Auxinas e citocininas acrescidas de sacarose em quantidades adequadas no meio de cultura *in vitro* são capazes de estimular a produção da ciclina da fase S, citocininas estimulam a ciclina mitótica para a diferenciação celular e o ácido abscísico interfere com a síntese

do complexo CDK-ciclina impedindo a célula de continuar o ciclo de multiplicação (Pozo *et al.* 2005). Esses efetores podem se acrescidos *in vitro* para o desenvolvimento de tecidos, órgãos e inclusive embriões somáticos, sendo considerados indutores para a cultura vegetal. A análise das concentrações endógenas dos compostos de reservas possibilitaria uma caracterização do início da divisão celular e seu papel na diferenciação.

2. Objetivos

(1) Estabelecer metodologia de calogênese de *S. spectabilis* com ácido 2,4-diclorofenóxiacético

(2) Estudar as variações de carboidratos totais, proteínas solúveis e amido envolvidos na indução de diferentes tipos de calos em cultura de tecido com 2,4-D; e

(3) analisar a produção do alcalóide espectralina dos diferente tipos de calos cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de 2,4-D.

3. Material e métodos

3.1. Obtenção de material vegetal

Entre agosto e setembro de 2007 realizou-se a coleta de frutos maduros não deiscentes ainda apensos à árvore existente no Instituto de Botânica. Os frutos foram coletados de árvores distintas, em área próxima à Seção de Ornamentais e no campo experimental da Seção de Ornamentais. Após a coleta dos frutos, estes foram secos à temperatura ambiente e tiveram suas sementes retiradas (figura 4) e armazenadas a 4 °C em sacos de papel.

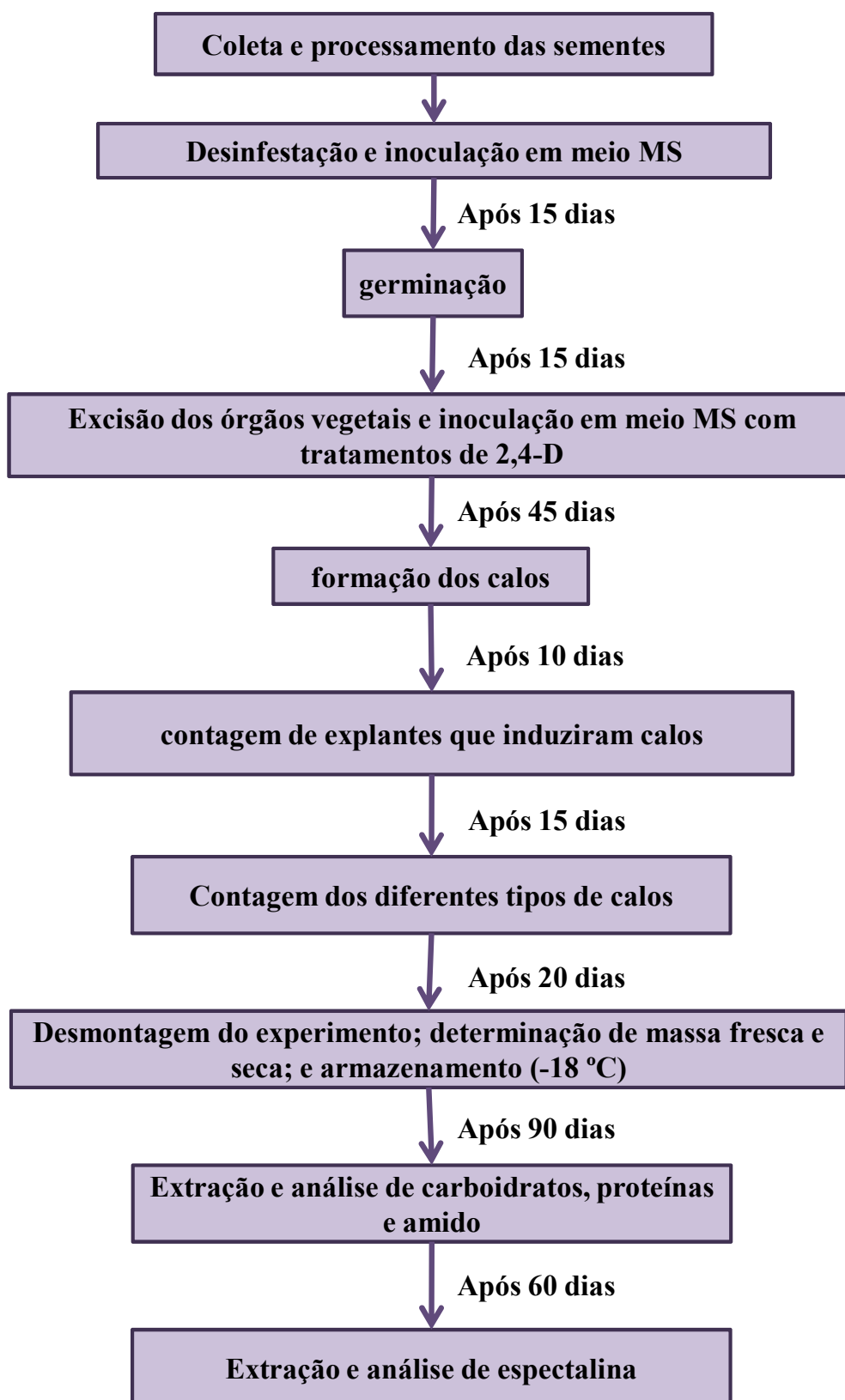
As sementes foram selecionadas em grupos de 60 unidades, retirando-se aquelas de tamanho reduzido e as que apresentaram manchas, lesões aparentes ou rachaduras que poderiam ter a viabilidade comprometida ou estarem contaminadas.



Figura 4: Sementes de *S. spectabilis*.

3.2. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura foi preparado a partir de protocolo desenvolvido por Murashigue & Skoog (1962), geleificado com 0,8% de ágar bacteriológico (Finer 1994), com adição de vitamina B5 (Gamborg *et al.* 1968), 3% de sacarose, o pH ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,2 atm até completa esterilização. A permanência dos frascos na autoclave por 35 minutos pode ser explicada pelos altos níveis de contaminação ocorridos durante a realização deste trabalho, o meio ao apresentou coloração levemente amarelada indicando baixos níveis de hidrólise da sacarose. O manômetro de pressão e o teste com Sterikon plus Bioindicator (Merck) indicam o correto funcionamento da autoclave em uso.



Fluxograma de desenvolvimento das etapas do experimento de indução e análise dos calos de *Senna spectabilis*

3.3. Inoculação das sementes

Efetuiu-se o processo de descontaminação superficial das sementes mergulhando-as em ácido sulfúrico 96 % (Merck) por 45 min agitando-se a cada 5 min com bastão de vidro. Após lavagem com água corrente, realizou-se desinfestação superficial com etanol 80 % antes de as sementes serem transferidas para ambiente asséptico e lavagem com água destilada estéril por cinco vezes.

Foram inoculadas 20 sementes por frasco de vidro (130 mL) contendo 25 mL de meio de cultura MS completo (Murashige & Skoog 1962). O procedimento foi realizado em câmara asséptica, sendo os frascos fechados com tampa plástica de polipropileno. Após a inoculação, as culturas foram transferidas para sala de crescimento (PAR = 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h) e mantidas até a germinação e crescimento das mudas.

3.4. Inoculação de explantes

Plântulas de aproximadamente 3,0 cm de altura (três semanas) foram retiradas dos frascos e fragmentadas dentro da câmara de fluxo laminar com o uso de pinça e bisturi previamente esterilizados em autoclave. Diferentes órgãos vegetais, como cotilédones, hipocótilo, epicótilo e folhas foram seccionados e inoculados em meio MS contendo diferentes quantidades da auxina ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D a 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L^{-1}), onde permaneceram por 45 dias, até a formação de calos. Utilizaram 20 frascos para cada tratamento, cada frasco contendo os órgãos seccionados de uma planta.

Os cotilédones foram divididos pela metade, totalizando quatro fragmentos. Separaram-se os primórdios foliares com auxílio de pinça e com o bisturi realizou-se uma pequena incisão pressionando com a ponta do bisturi sobre a superfície do primórdio foliar antes de inoculá-las no meio de cultura para induzir a formação inicial de calos. O epicótilo, que corresponde à região do caule entre o nó cotiledonar e a

primeira gema apical, e o hipocótilo, região caulinar entre o nó cotiledonar e o início da raiz, foram segmentados pela metade, totalizando quatro fragmentos, e inoculados horizontalmente em relação ao meio de cultura (figura 5).

Todos os tratamentos foram mantidos em salas de crescimento, nas mesmas condições de germinação e crescimento das plantas descritas anteriormente.

3.5. Análises biométricas e preparo de amostras

Após a formação dos calos (45 dias), foi realizada contagem seguida por classificação dos mesmos em friável (figura 6), nodular (figura 7), compacto (figura 8) e oxidado. Os diferentes tipos de calos foram separados, independente da origem do calo, e determinou-se a massa fresca utilizando-se balança analítica. Posteriormente o material vegetal foi dividido em três amostras, novamente pesado e congelado para a determinação de massa seca após sua liofilização. Decorrido uma semana, as massas das amostras secas foram determinadas e realizaram-se as extrações de carboidratos, proteínas e amido.

O tratamento com 20,0 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentou massa fresca insuficiente no momento das extrações e dosagens bioquímicas, sendo então os calos deste tratamento reunidos com os respectivos tipos de calos do tratamento 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

3.6. Extração e determinação dos teores de carboidratos solúveis totais, proteínas solúveis e amido

O material liofilizado (correspondentes a 0,5 a 2,0 g de massa seca) foi homogeneizado utilizando-se almofariz e pistilo. Em seguida acrescentou-se etanol 80 % e levou-se para incubar em banho-maria a 80 °C por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 125 g durante 10 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi separado. Uma segunda extração foi realizada adicionando-se etanol 80 %, seguido pela incubação em banho-maria e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e seu volume aferido, sendo armazenado em frascos de 50 ml a 4 °C.

A extração de proteínas foi realizada utilizando-se tampão fosfato 0,2 M em pH 5,7, na proporção aproximada de 1:2 (1,0 g de massa seca do resíduo etanólico/2,0 mL de tampão). Adicionou-se o tampão fosfato ao resíduo da extração de carboidratos e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. Após incubação, a amostra foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4 °C. Depois de retirado o sobrenadante, realizou-se uma segunda extração com os mesmos parâmetros anteriores e os sobrenadantes foram juntados. Em seguida, o volume da amostra de proteínas solúveis totais em tampão fosfato foi determinado e armazenado (-19 °C) em frascos escuros de 30 mL.

Para a extração de amido adicionou-se, ao resíduo final, após a extração de proteínas solúveis, ácido perclórico 52 % (10 mL de ácido para 1,0 g de massa seca inicial) e foram incubadas em banho de gelo (4 °C) por 20 min com agitação a cada 5 min. Em seguida realizou-se centrifugação a 750 g durante 10 min e o sobrenadante coletado. Uma segunda extração foi realizada seguindo-se os mesmos procedimentos. Os sobrenadantes ácidos foram reunidos, o volume aferido e retirou-se 1,0 mL de cada amostra para armazenamento em microtubos (1,5 mL) a 4 °C.

A determinação dos carboidratos solúveis totais foram realizados em triplicata, utilizando-se o método do ácido fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 490 nm; os valores foram expressos em teores de carboidratos solúveis (mg carboidrato por grama de massa seca). A regressão linear tendo D-glucose como padrão foi representada pela equação $y = 82,259x - 4,3773$ ($R^2=0,9794$).

Os teores de proteína solúvel total em triplicata foram determinados de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando o corante Coomassie Blue G e tendo como padrão albumina bovina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm e o teor de proteína solúvel total expresso em mg de proteína por grama de massa seca (regressão linear $y = 682,8x - 7,309$; $R^2=0,9888$).

O amido foi determinado em triplicata também pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), multiplicando o valor obtido pelo fator de correção de 0,9.

3.7. Extração, purificação das amostras e preparo de padrão de espectralina

Para o preparo de padrão de espectralina, flores inteiras de *S. spectabilis* foram colhidas logo após o seu desprendimento do pedúnculo floral até obtenção de aproximadamente 500 g de matéria fresca. As flores frescas foram pesadas, liofilizadas, pesadas novamente e o material seco foi homogeneizado utilizando-se moinho de facas. A extração foi realizada adicionando-se 300 mL de etanol 80% e incubando em banho-maria a 80 °C durante 5 min e, após o resfriamento da amostra, as mesmas foram concentradas em roto-evaporador (Pivatto *et al.* 2005). Retirou-se 10 mL do extrato concentrado para congelar e liofilizar. Após determinação da massa seca do extrato vegetal, adicionou-se 60 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) aquoso 5 % e a amostra foi mantida a 4 °C por uma noite. Posteriormente, o extrato foi filtrado para eliminar os resíduos sólidos e com a adição de 15mL de hexano, a porção não alcalóide (lipídeos) foi separada. Ajustou-se o pH da fase ácida para 9,0 adicionando-se hidróxido de amônio (NH₄OH) concentrado e realizou-se partição líquido-líquido novamente utilizando diclorometano (CH₂Cl₂) na proporção 1:5. A fase orgânica foi retirada e concentrada, constituindo a fração alcalóide bruta.

Os extratos etanólicos dos diferentes tipos de calos e tratamentos foram preparados seguindo-se a metodologia descrita anteriormente, com reagentes e solventes em volumes proporcionais.

3.8. Análise por cromatografia a Gás-Líquido (CG-FID)

A análise cromatográfica foi realizada seguindo a metodologia desenvolvida por Silva (2009). As frações de alcalóides foram analisadas em cromatógrafo a gás Varian Chrompack CP-3380, com detector de ionização de chama (FID), gás de arraste Hélio, e coluna Supelco SPB-1 (30 m X 0,25 mm), injeção de 1,0 µL da amostra, e concentração de 4,0 mg.mL⁻¹ em acetato de etila grau HPLC (condições de corrida: injetor a 300 °C, detector a 300 °C, temperatura inicial 210 °C por 1 min aumentando 1 °C por min até 250 °C; tempo total de corrida 40 min).

3.9. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer e utilizando-se o programa Sigma Stat versão 3.1 (Sigma Stat Software Inc., Chicago, USA). Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. Foram considerados como significativas diferenças com $p < 0,05$.

Os gráficos apresentados foram gerados pelo programa Microsoft Excel (gráficos de colunas) e Origin Pro 8.0 (gráficos de linha com erro padrão onde o eixo y está em escala de probabilidade e o ponto $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D foi inserido; gráficos de superfície de resposta em 3D para melhor visualização dos resultados).

4. Resultados

Observou-se que alguns dias após a inoculação os explantes apresentaram aumento de tamanho, sendo este mais acentuado nos cotilédones e folhas (figura 5). Após o inchaço e alargamento dos tecidos teve início a formação de calos.



Figura 5. Explantes de *Senna spectabilis* distribuídos em frasco de cultura contendo meio MS acrescido de regulador vegetal. Foto tirada 10 dias após a inoculação.

Os calos friáveis (figura 6) apresentaram, em sua maioria, aparência esponjosa de coloração esbranquiçada, amarelada ou acinzentada. Não houve formação de calos friáveis com aparência leitosa. Cresceram em velocidade e tamanho superiores aos demais calos, em especial os calos dos tratamentos 10 e 40 mgL^{-1} de 2,4-D, consumindo os nutrientes do meio de cultura com maior rapidez. Apresentaram estrutura delicada, se fragmentando com facilidade, pois suas células possivelmente não estavam coesas.

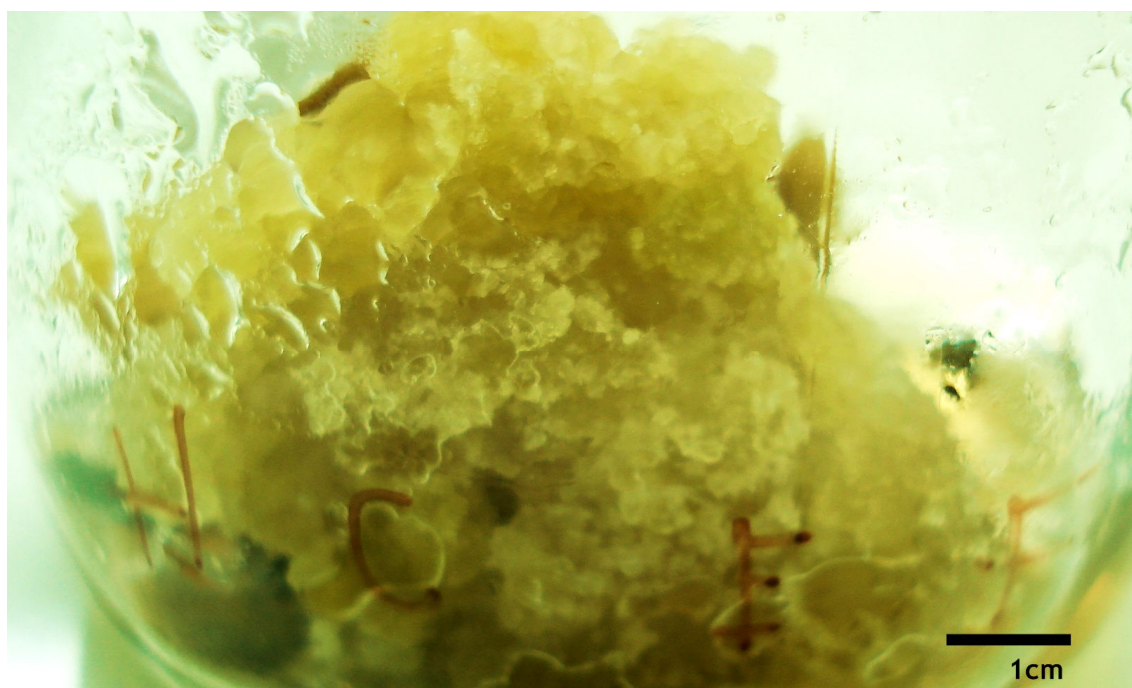


Figura 6. Calo friável obtido durante os experimentos a partir de explantes de *S. spectabilis* (tratamento 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D). Foto tirada 45 dias após inoculação.

Os calos do tipo nodular foram considerados, como os calos de maior semelhança morfológica aos calos com embriões somáticos conforme descrito na literatura. Os nódulos globulares poderiam estar associados às protuberâncias embriogênicas sugeridas por Rodriguez & Wetzstein (1998) ou poderiam estar associados à fase globular do desenvolvimento do embrião somático.

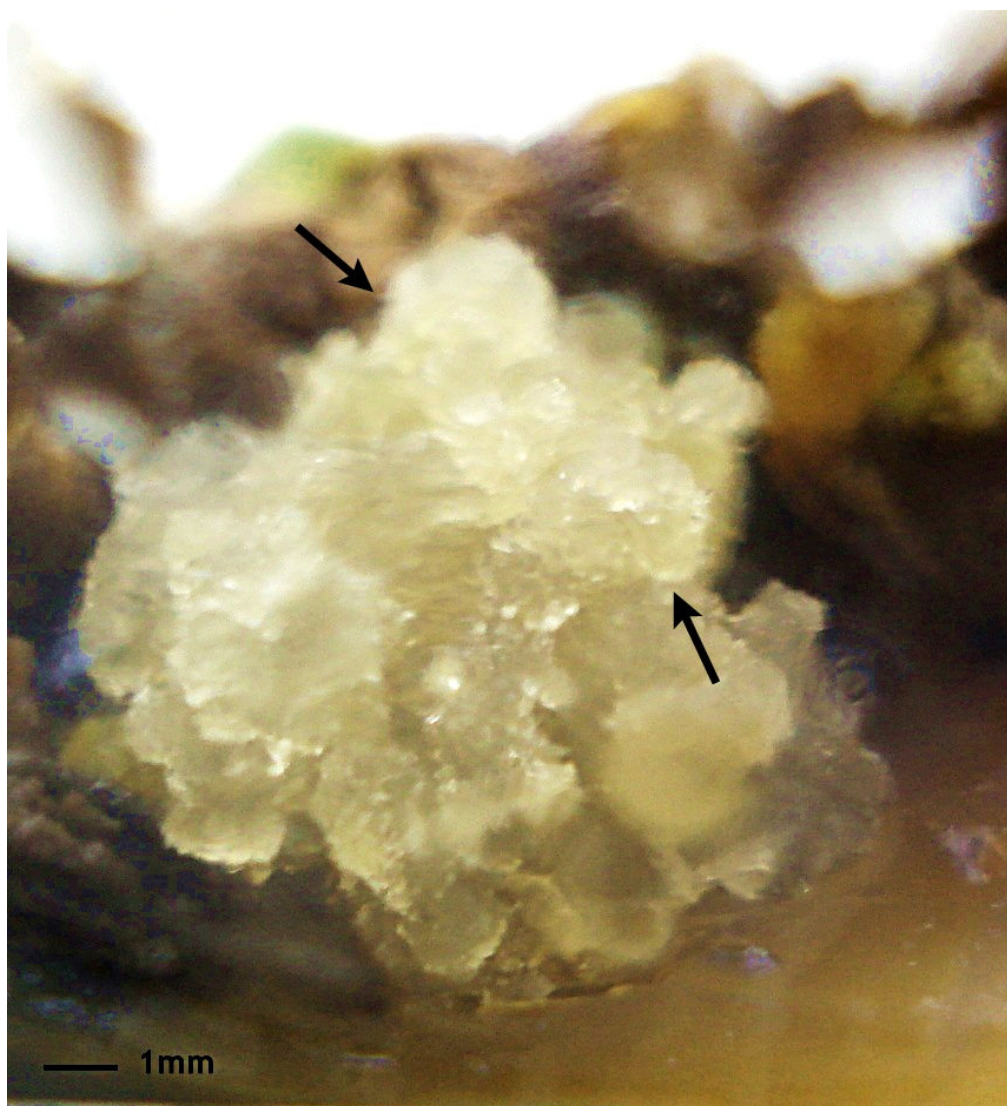


Figura 7. Calo nodular desenvolvido *in vitro* a partir de explantes de *S. spectabilis* (tratamento 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D); setas indicam os nódulos globulares que caracterizam esse tipo de calo. Foto tirada 45 dias após inoculação.

Os calos compactos (figura 8) apresentaram tamanho menor em relação aos demais tipos de calos, geralmente eram de cor verde intenso ou brancos, nunca transparentes. Apresentaram superfície com aspecto aveludado, sendo calos muito resistentes ao corte e podendo ser considerados como massa celular compacta.

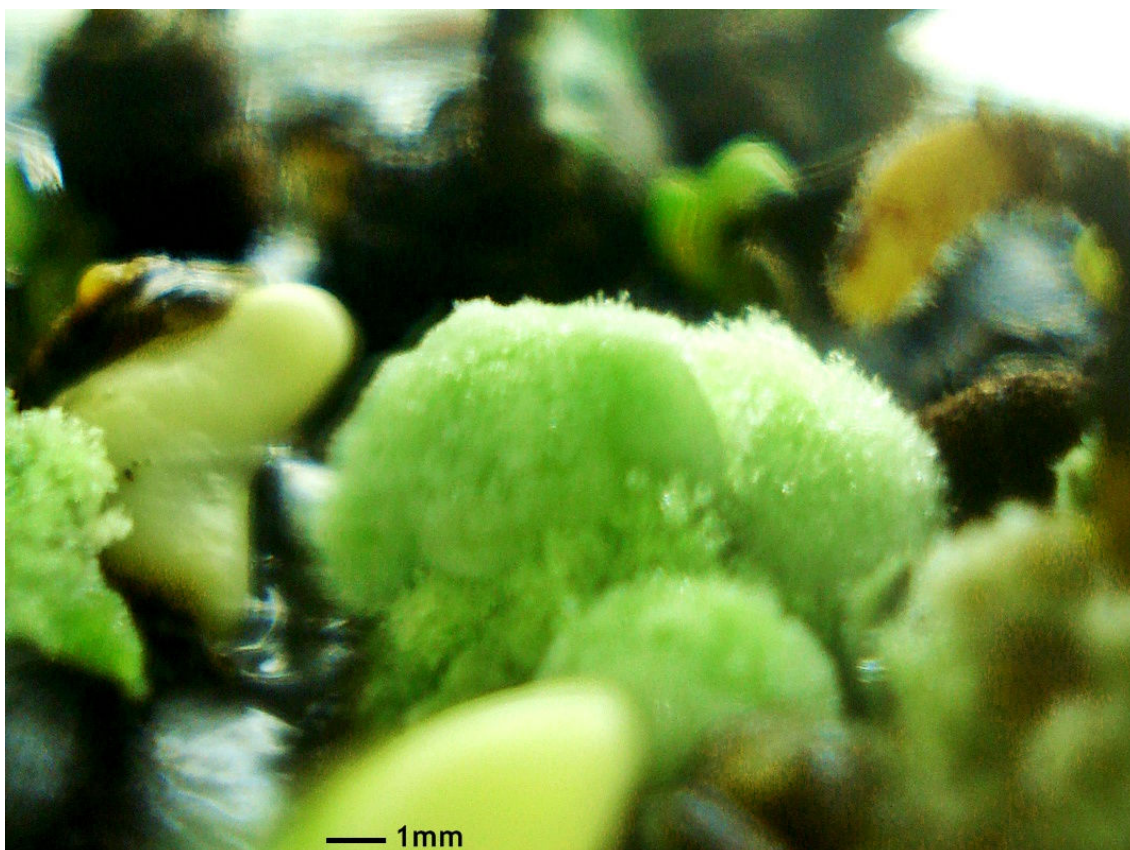


Figura 8. Calo compacto desenvolvido *in vitro* a partir de explantes de *S. spectabilis* (tratamento $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D). Foto tirada 45 dias após formação de calos.

4.1. Indução de calos por tratamento em função do explante

Analisando os tipos de explantes separadamente, observou-se diferentes respostas entre os tratamentos (tabela 1). O tratamento que demonstrou melhor resposta à calogênese a partir do hipocótilo correspondeu a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D com aproximadamente 85 % de formação de calos. O mesmo tratamento também apresentou o maior índice de indução de calos no fragmento epicótilo apresentando mais de 80 % de resposta. O tratamento $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, por outro lado, correspondeu à menor indução com apenas 11 % de formação de calos a partir do hipocótilo e baixos índices

de formação de calos através do fragmento epicótilo também com apenas 11 % de indução. Os cotilédones responderam bem ao tratamento 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentando valores de formação de calos acima de 70 %, enquanto que sob o tratamento 0,0 mg L⁻¹ de 2,4-D esses fragmentos apresentaram apenas 3 % de resposta. O mesmo ocorreu com as folhas primárias, que não apresentaram mudanças significativas no tratamento 0,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, e responderam bem ao tratamento 2,5 mg L⁻¹ com quase 80 % de indução.

Tabela 1. Indução de calos (%) de *Senna spectabilis* nos tratamentos 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20 e 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em função do explante (hipocótilo, epicótilo, cotilédones e folha). Observação realizada 15 dias após inoculação.

Tratamento de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Indução de calos (%)			
	Hipocótilo	Epicótilo	Cotilédone	Folha
0,0	25,0	21,9	3,1	1,6
0,12	65,8	71,0	61,8	52,6
0,25	82,0	65,3	66,7	68,1
0,5	86,7	83,3	45,0	78,3
2,5	76,6	78,1	73,4	79,7
5,0	70,0	61,7	55,0	50,0
10,0	71,7	73,3	73,3	58,3
20,0	60,0	70,0	72,5	65,0
40,0	11,7	11,7	45,0	21,7

4.2. Indução dos diferentes tipos de calos por tratamento

A observação dos tipos de calos foi realizada 30 dias após a sua formação (tabela 2). Foi possível notar que a formação de diferentes tipos de calos não foi constante para todos os tratamentos. Alguns não induziram a formação de calos nodulares como no caso dos tratamentos 0,0 e 0,25. Observou-se que houve maior índice de formação de calos friáveis em relação aos calos nodulares e compactos. Os tratamentos 0,12; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D foram os únicos a apresentarem calos oxidados e células em processo de senescência.

Tabela 2. Tipos de calos (%) de *S. spectabilis* formados por tratamento ao longo do experimento. Contagem realizada 30 dias após a formação de calos

Tratamento de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Tipo de calos (%)		
	Friável	Nodular	Compacto
0,0	25,0	0,0	75,0
0,12	51,1	2,0	46,9
0,25	81,8	0,0	18,2
0,5	41,9	45,2	12,9
2,5	48,8	39,5	11,6
5,0	52,6	38,6	10,5
10,0	57,9	38,6	5,3
20,0	51,5	45,5	3,0
40,0	40,0	40,0	20,0

4.3. Massa de matéria fresca e seca dos calos por tratamento

Foi possível observar que a quantidade de massa fresca dos calos tipo friável (figura 9) superou à dos demais calos ($p < 0,05$) e observou-se também que o aumento da concentração de auxinas promoveu a multiplicação e expansão dessas células.

O teor de massa seca (figura 10), contrariamente ao gráfico de massa fresca, foi significativamente maior nos calos tipo compacto quando comparado aos calos tipo friável ($p < 0,01$). O tratamento $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D apresentou calos compactos com o maior teor de massa de matéria seca em comparação aos demais. Os calos friáveis produzidos no meio de $20+40,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D apresentaram menor teor de massa de matéria seca.

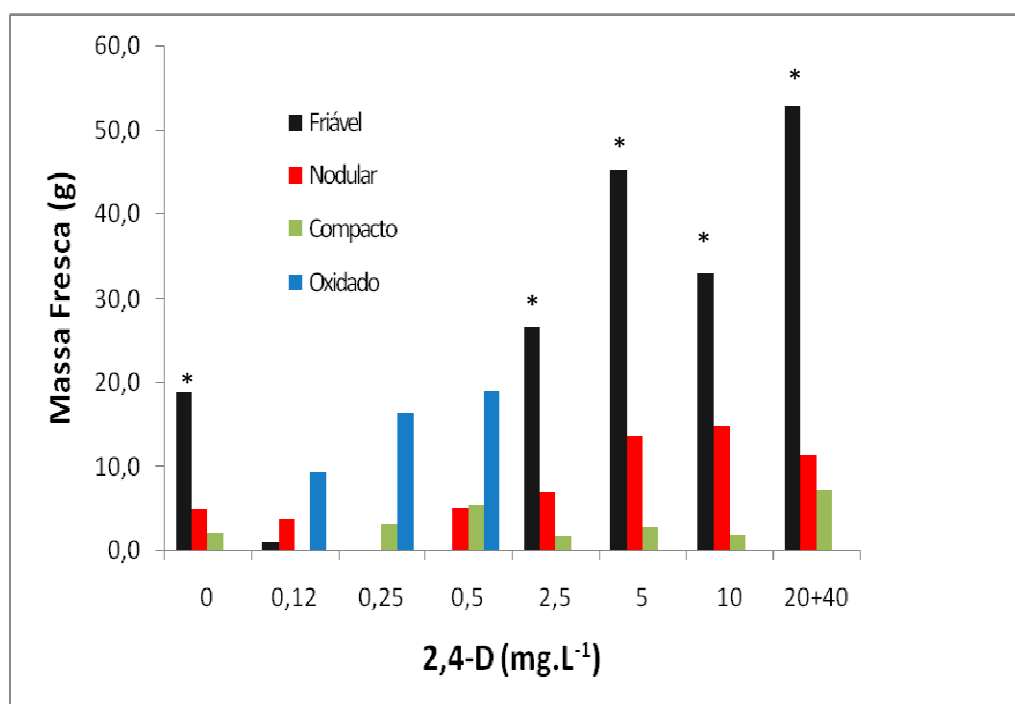


Figura 9. Massa fresca dos diferentes tipos de calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20+40,0 mg L^{-1} de 2,4-D. *diferença significativa $p < 0,05$ de calos nodular, compacto e oxidado para os tratamentos 0,0; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20+40 mg L^{-1} de 2,4-D. (Anexo 1)

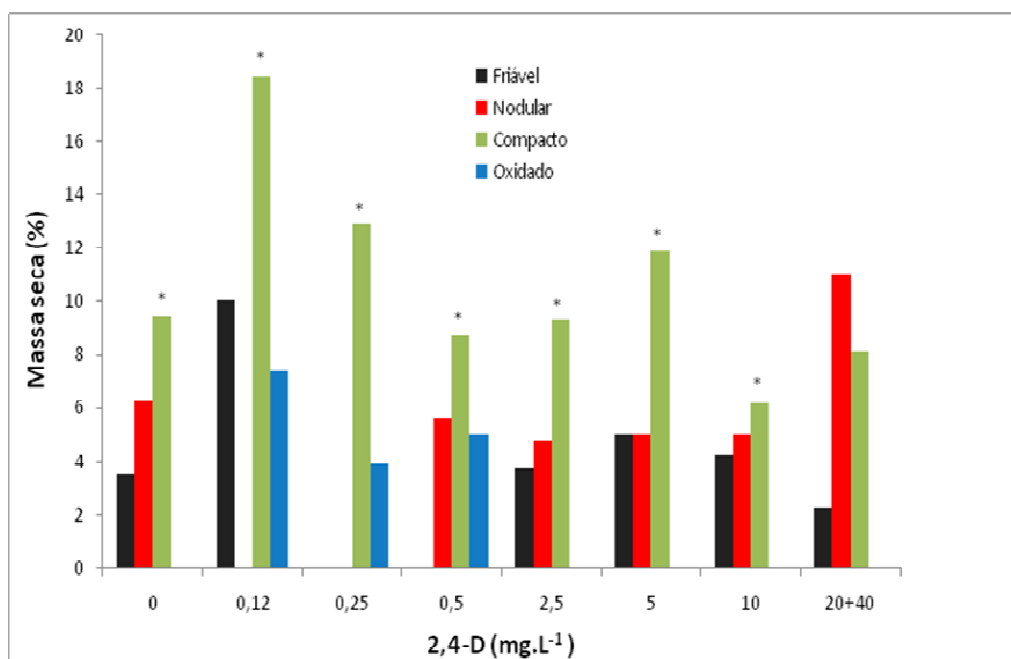


Figura 10. Teor de massa de matéria seca (%) dos diferentes calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D (0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20+40,0 mg L⁻¹). *diferença significativa $p < 0,05$ de calos friáveis em todas as concentrações de 2,4-D estudadas, exceto para 20+40. (anexo 2)

4.4. Carboidratos totais

A análise dos carboidratos solúveis por grama de massa seca (figura 11) demonstrou que os calos friáveis cultivados em 0,12 mg L⁻¹ ($p < 0,001$) e 40,0 mg L⁻¹ ($p < 0,001$) de 2,4-D apresentaram acúmulo significativamente maior que nas concentrações 0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Com relação ao calo nodular, o tratamento 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentou menor acúmulo de carboidratos solúveis ($p < 0,001$) comparado a todos os demais tratamentos (0,0; 0,5; 2,5; 5,0 e 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D). Os tratamentos entre 0,5 a 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D não apresentaram diferenças significativas para o acúmulo de carboidratos para este tipo de calo.

A concentração de carboidratos solúveis totais nos calos friáveis apresentou-se reduzida no tratamento 0,25 mg L⁻¹ de 2,4-D comparado às concentrações 0,0 ($p < 0,01$),

0,12 ($p<0,001$), 0,5 ($p<0,05$) 2,5 ($p<0,05$) e 10,0 mg L^{-1} de 2,4-D ($p<0,001$). Na concentração de 10,0 mg L^{-1} de 2,4-D o acúmulo de carboidratos foi menor quando comparado aos tratamentos 0,0; 0,12; 0,5; 2,5; 5,0 e 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D ($p<0,001$). Observou-se que os calos compactos cultivados com 0,12 mg L^{-1} de 2,4-D apresentaram maior acúmulo de carboidratos do que todas as outras concentrações ($p<0,05$) exceto quando comparado à concentração de 0,0, 0,5 e 2,5 mg L^{-1} de 2,4-D ($p>0,05$).

Com 0,12 mg L^{-1} de 2,4-D o teor de carboidratos foi maior comparado aos demais tratamentos ($p<0,05$). O teor de carboidratos foi menor entre os tratamentos 0,5 a 10 mg L^{-1} de 2,4-D, este último apresentando concentrações significativamente menores que as anteriores ($p<0,001$).

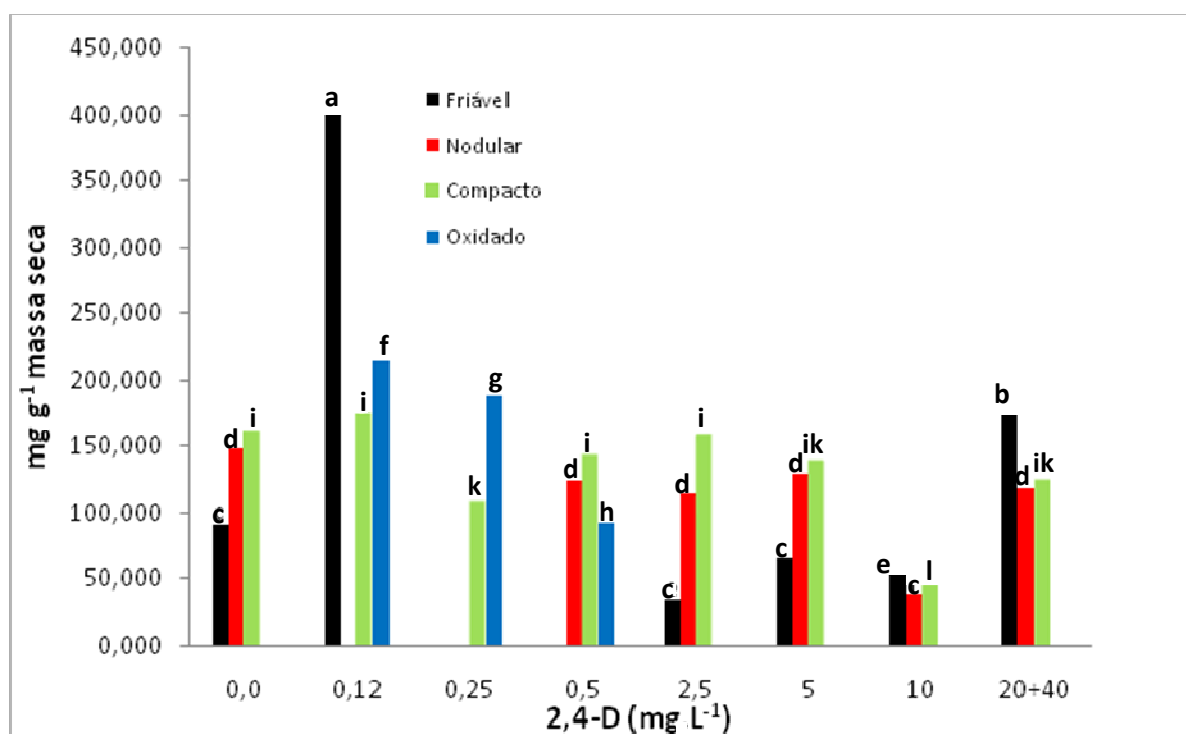


Figura 11. Teores de carboidratos solúveis totais (mg g^{-1} massa seca) nos diferentes calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D (0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20+40,0 mg L^{-1}). Letras minúsculas diferentes indicam valores estatisticamente diferentes. Calo friável (anexo 3), calo nodular (anexo 4), calo compacto (anexo 5) e calo oxidado (anexo 6).

4.5. Proteínas

O tratamento controle, sem adição de auxina, desenvolveu calos friáveis com teores de proteínas solúveis (figura 13) próximos a 50 mg.g^{-1} massa seca. Os tratamentos com $10,0$ e $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ (2,4-D) apresentaram maior teor de proteínas solúveis ($p<0,05$) apresentando valores acima de 100 mg g^{-1} massa seca. O tratamento $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (2,4-D) apresentou teor de proteínas solúveis semelhante ($p>0,05$) àquele encontrado no tratamento nos calos friáveis do controle.

Os calos do tipo nodular formados no tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (2,4-D) apresentaram maior teor de proteínas solúveis totais (acima de 300 mg g^{-1} massa seca, $p<0,001$) em relação à todos os outros tratamentos. Os tratamentos $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, apresentaram os menores valores de proteínas solúveis ($p<0,05$) comparado aos demais tratamentos.

Para os calos compactos, o acúmulo de proteínas solúveis foi estatisticamente maior nas concentrações de $0,12$; $0,5$; $2,5$; $5,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D ($p<0,01$) comparado aos tratamentos $0,0$; $0,25$ e $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. O tratamento com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D apresentou acúmulo de proteínas solúveis estatisticamente iguais ao $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

Os calos oxidados apresentaram maiores teores de proteínas solúveis nos tratamentos de $0,12$; $0,25$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, sendo expressivamente menor na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D ($p<0,001$).

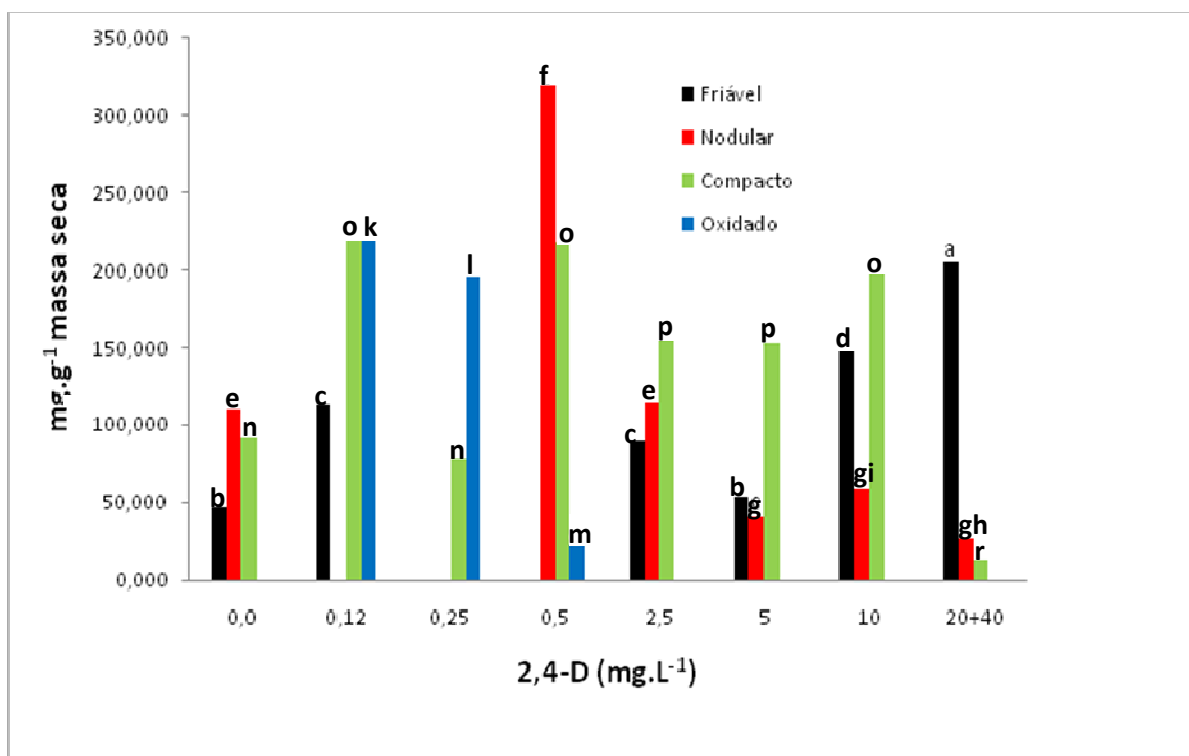


Figura 12. Teores de proteínas solúveis (mg g⁻¹ massa seca) nos calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D (0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹). Letras minúsculas diferentes indicam valores que diferem estatisticamente. Calo friável (anexo 7), calo nodular (anexo 8), calo compacto (anexo 9) e calo oxidado (anexo 10)

4.6. Amido

Foi possível observar que os tratamentos 10,0 mg L⁻¹ e 40,0 mg L⁻¹ (2,4-D) apresentaram calos friáveis com as maiores concentrações de amido (figura 15) ($p < 0,001$) em comparação aos demais tratamentos 0,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹. Os calos classificados como nodulares apresentaram maiores teores de amido nos tratamentos 10,0 mg L⁻¹ ($p < 0,01$) quando comparado aos demais tratamentos. No tratamento 2,5 mg L⁻¹ 2,4-D os calos nodulares apresentaram maior teor de amido ($p < 0,5$) em relação aos cultivados nos tratamentos com 0,0; 0,5; 5,0 e 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, mas apresentou concentração, estatisticamente, inferior em comparação ao tratamento 10 mg L⁻¹ de 2,4-D

A quantidade de amido nos calos compactos não apresentou muitas variações em relação aos tratamentos. Entretanto foi possível observar que a concentração de amido nos tratamentos 0,25 e 2,5 mg L⁻¹ 2,4-D ($p < 0,05$) foi estatisticamente maior em relação

aos demais tratamentos. Os calos compactos cultivados sob o tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram menor teor de amido ($p < 0,01$) se comparado aos cultivados em outros tratamentos.

Os calos oxidados apresentaram teores baixos de amido apenas nos tratamentos $0,12$; $0,25$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2.4-D, sendo que os calos cultivados sob o tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2.4-D apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,001$) em relação aos cultivados sob os tratamentos $0,12$ e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2.4-D.

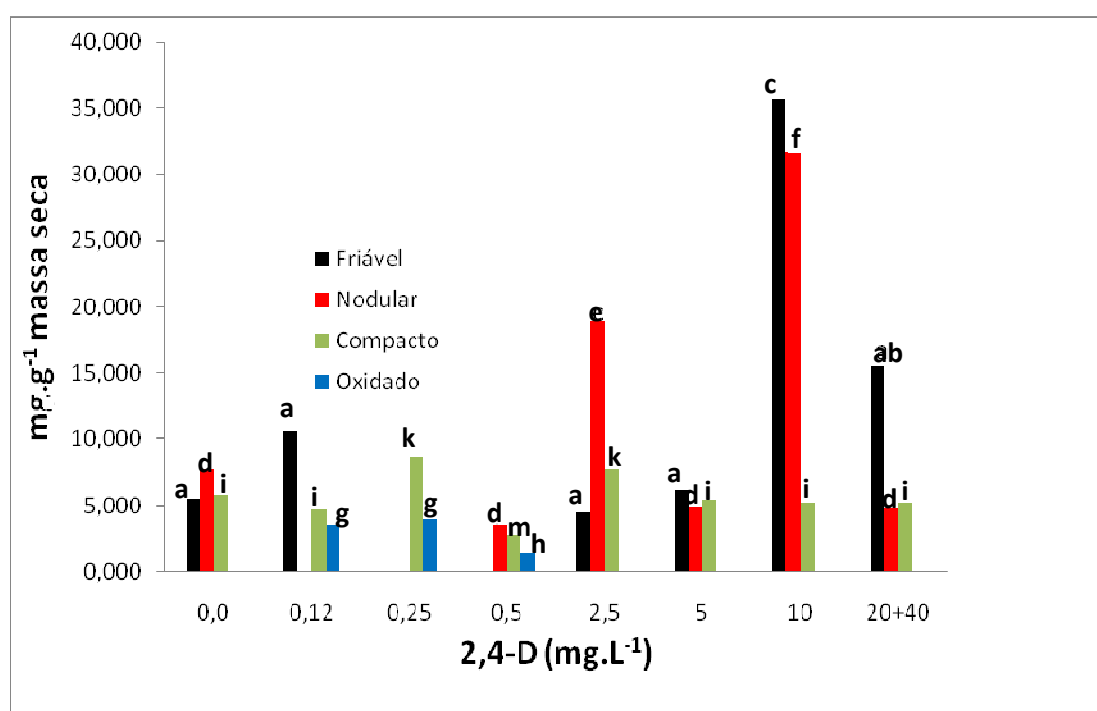


Figura 13. Teores de amido (mg g^{-1} massa seca) nos diferentes calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D ($0,0$; $0,12$; $0,25$; $0,5$; $2,5$; $5,0$; $10,0$; $40,0 \text{ mg L}^{-1}$). Letras minúsculas diferentes indicam valores que diferem estatisticamente. Calo friável (anexo 11), calo nodular (anexo 12), calo compacto (anexo 13) e calo oxidado (anexo 14).

4.7. Somatória dos compostos de reserva

Comparando os dados obtidos para os compostos de reserva analisados (Figura 17) foi possível inferir que o tratamento $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ (2,4-D) apresentou calos com maiores quantidades de compostos de reserva em relação aos demais tratamentos embora não tenha induzido a formação de calos tipo nodular

O tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D apresentou calos nodulares com grande quantidade de compostos de reserva, com a soma total dos valores ultrapassando 400 mg g^{-1} massa seca. Os calos tipo friável deste mesmo tratamento, por outro lado, apresentaram teores de compostos de reservas inferiores aos calos friáveis dos demais tratamentos, estando abaixo de 150 mg g^{-1} massa seca. O tratamento $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, apresentou calos compactos com maiores concentrações de compostos de reserva em relação aos calos nodular e friável deste mesmo tratamento.

O tratamento $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D desenvolveu calos compactos com maiores valores de compostos de reserva em relação aos demais calos, 320 mg g^{-1} massa seca.

Os resultados para o tratamento $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D demonstraram que os calos friáveis e compactos continham aproximadamente 250 mg g^{-1} massa seca de compostos de reserva. Entretanto, os calos nodulares sob este tratamento, apresentaram o menor valor em relação aos demais tratamentos. O tratamento $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D apresentou calos friáveis com maiores teores de compostos de reserva em relação aos demais tratamentos, exceto quando comparado ao tratamento $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D. Os calos compactos e nodulares do tratamento $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, por outro lado, apresentaram valores baixos, em comparação aos demais tratamentos.

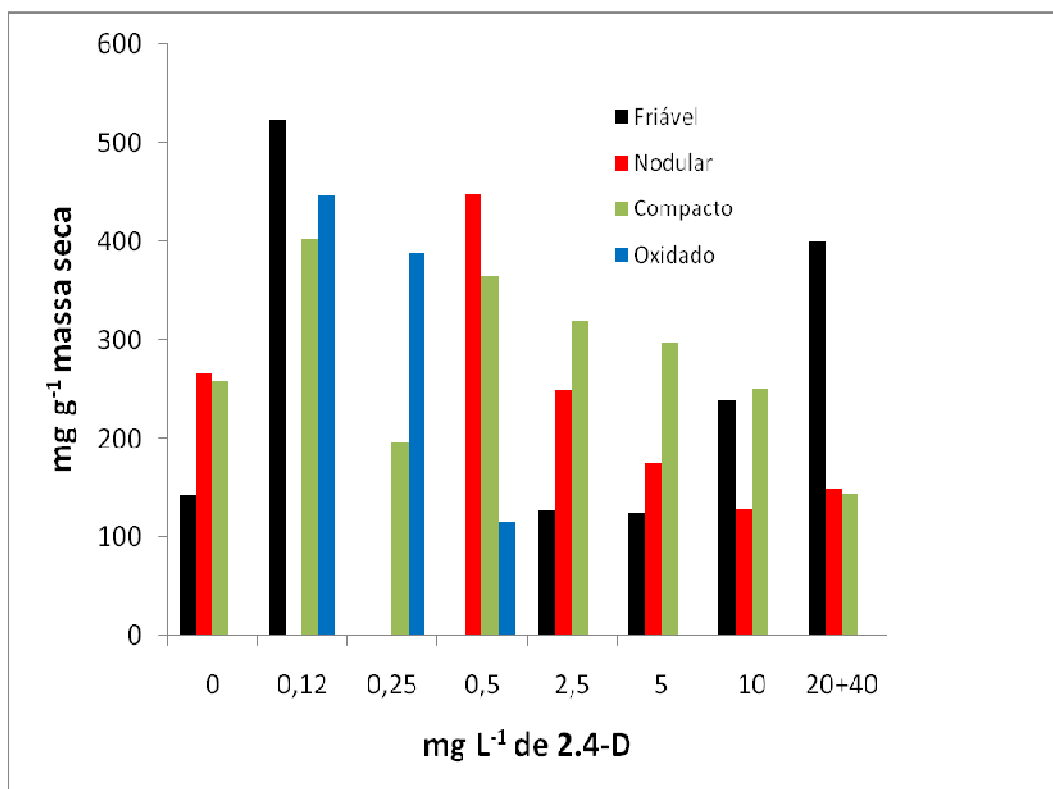


Figura 14. Somatória dos compostos de reserva (mg g⁻¹ massa seca) dos diferentes calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D (0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹).

4.8. Espectralina

A análise de espectralina (mg g⁻¹ massa seca) dos calos nodulares, friáveis, compactos e oxidados não mostrou diferenças estatísticas entre os tipos de calos.

Pôde-se observar a presença de espectralina nos calos nodulares dos tratamentos 0,0 e 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (figura 19). Nos calos tipo compacto observou-se a presença de espectralina nas concentrações 0,12; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. No tratamento 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D foi possível verificar a presença de espectralina nos calos oxidados. Os calos friáveis apresentaram teores de espectralina nos tratamentos 2,5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Não foi observada presença de espectralina em nenhum dos calos cultivados sob o tratamento 40 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Tabela 3. Quantidade de espectralina (mg g⁻¹MS) detectada pelo CG-FID nos diferentes tratamentos. * não detectado.

Tratamento de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Tipos de calos (mg g ⁻¹ MS)			
	Friável	Nodular	Compacto	oxidado
0,0	0*	0,041	0*	0*
0,12	0*	0*	0,056	0*
0,25	0*	0*	0,024	0*
0,5	0*	0*	0,072	0,019
2,5	0,051	0*	0*	0*
5,0	0*	0,049	0*	0*
10	0,008	0*	0*	0*
20+40	0*	0*	0*	0*
Padrão (inflorescência)	6,82			

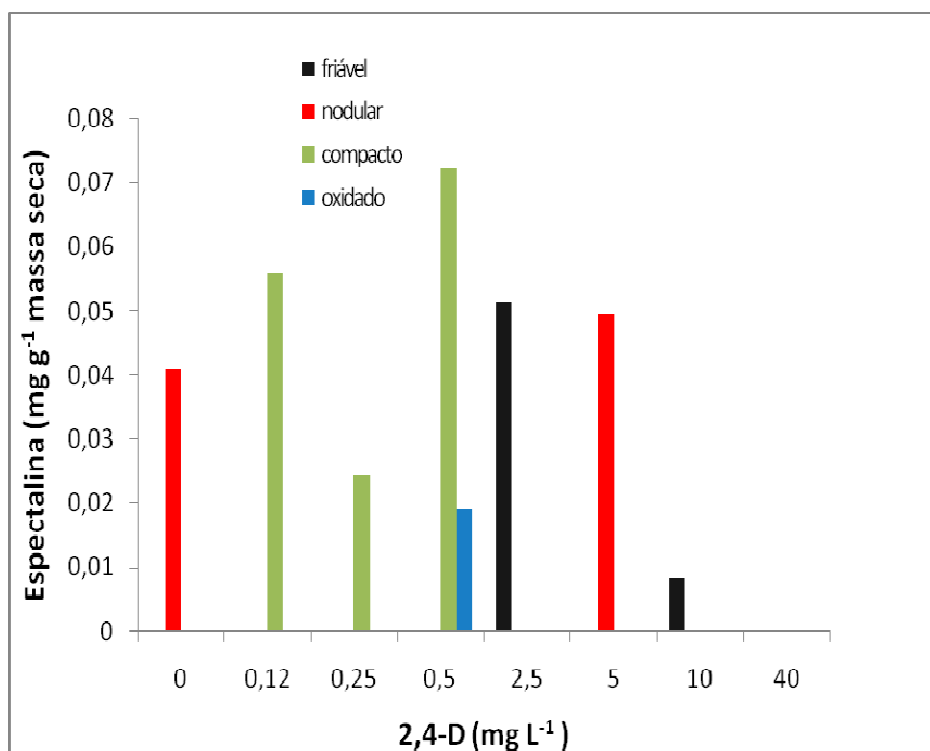


Figura 15. Teores de espectralina (mg g⁻¹ massa seca) dos diferentes calos, provenientes de explantes de *S. spectabilis*, (friável, nodular, compacto e oxidado) cultivados sob os tratamentos de 2,4-D (0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹).

5. Discussão

O estudo demonstrou que diferentes concentrações de 2,4-D influenciam a formação e diferenciação de calos, bem como as concentrações de carboidratos solúveis totais, amido e proteínas solúveis totais em modelo de cultura a partir de explantes jovens de *Senna spectabilis*.

5.1. Formação de calos

A indução eficiente da multiplicação celular na cultura de calos se deve à ação da auxina sintética 2,4-D, mesmo em baixas concentrações (tabela 1) (Tu *et al.* 2001). Apesar de a indução inicial da formação de calos ter diferido entre os tipos de explantes nas diferentes concentrações de 2,4-D mg L^{-1} , é possível inferir que as concentrações estudadas, com exceção das concentrações 20 e 40 mg L^{-1} , foram suficientes para induzir a multiplicação celular e formação dos diferentes tipos de calos com diferentes quantidades de compostos de reserva. Os dados corroboram os resultados de Campanoni & Nick (2005) que, utilizando a concentração de 10 μM (2,2 mg L^{-1}) de 2,4-D em explantes provenientes do epicótilo de tabaco (*Nicotiniana tabacum* L.) demonstraram que o regulador induz a multiplicação celular em culturas. Neste mesmo trabalho os autores também demonstraram que o 2,4-D apresentou maior taxa de multiplicação celular do que a auxina ANA aplicada nas mesmas concentrações.

Os resultados apontam que todos os fragmentos expostos possuíam células competentes para receber o estímulo da auxina adicionada ao meio de cultura, uma vez que todos os fragmentos responderam à indução de desdiferenciação e multiplicação provocada pela auxina. De acordo com Loyola-Vargas & Vazquéz-Flota (2006) e George *et al.* (2008) há uma variedade de órgãos e tecidos que são induzíveis via auxinas e estes variam, na maioria dos casos, conforme a espécie em estudo. Em dicotiledôneas, os tecidos de diversas partes da planta são induzidos com facilidade, porém nem todos os tecidos e órgãos são induzíveis nas monocotiledôneas (George *et al.* 2008.). Entretanto, a cultura de calos é mais facilmente estabelecida a partir de determinados órgãos em relação a outros. Isto se deve ao fato de algumas células

possuírem a capacidade de perceber, traduzir e responder a um sinal, caso contrário não são alvos adequados para a ação de reguladores vegetais (Osbourne & McManus 2005).

Um dos focos iniciais do trabalho visava a indução de embriogênese somática a partir dos explantes retirados de plântulas germinadas *in vitro*, entretanto as células, embora em multiplicação, não responderam ao tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D, não ocorrendo a formação de brotações ou raízes. A não formação de novos brotos provavelmente está ligada ao fato de a cultura dos calos ter sido realizada inteiramente em meio contendo auxina e, de acordo com Silveira *et al.* (2004), a presença constante de auxina no meio de cultura influencia a formação de embrióides não polares comprometendo o desenvolvimento de embriões somáticos na fase de maturação.

A aparência dos calos também pode ser considerada um fator importante para o sucesso da indução de embriogênese somática. Pal *et al.* (2006) em estudo com regeneração via organogênese a partir de fragmentos de hipocótilo e cotilédones de *Curcubita pepo* L. consideraram como potencialmente organogênicos os calos friáveis e nodulares com aspecto leitoso, e descartaram calos de aparência esponjosa e excessivamente úmida (calos vitrificados), calos muito compactos ou de cor marrom. Estes mesmos autores observaram a presença de pontos esverdeados nos calos indicando início do processo de maturação dos embriões somáticos. O tempo de incubação pode ser outro fator que, juntamente com a presença da auxina, reduziu o potencial embriogênico dos tecidos cultivados e a diferença no aspecto dos calos desenvolvidos pela espécie estudada. Sugere-se que o tempo de incubação e exposição dos tecidos ao 2,4-D, neste trabalho, foi excessivamente prolongada e, portanto, prejudicou a indução da embriogênese somática.

As leguminosas arbóreas são consideradas espécies recalcitrantes na cultura de tecidos e, portanto, não apresentam respostas de indução de tecidos ou órgãos com concentrações baixas de reguladores de crescimento descritas nos protocolos de multiplicação celular (Gharyal & Maheshwari 1990; Machuka *et al.* 2002). Entretanto, foi possível induzir a formação de uma cultura de calos com o uso da auxina 2,4-D em diferentes concentrações, preferencialmente nas concentrações mais baixas de 2,4-D (0,12; 0,25; 0,5 e 2,5 mg L⁻¹).

O inchaço e alargamento observado nos explantes (observados no início do experimento) do presente estudo também foi encontrado em trabalhos realizados por diversos autores, Shrivastava *et al.* (2006), estudando a espécie *Cassia senna* (L.) var. *senna*, observaram inchaço e aumento do tamanho do explante três semanas após inoculação. O mesmo resultado foi observado por Agrawal & Sardar (2006) durante indução de embriogênese e organogênese de *Cassia angustifolia* Vahl. O inchaço e o aumento do tamanho dos explantes possivelmente se devem a presença de reguladores de crescimento, que estimulam a divisão e o alongamento da célula. Sabe-se que auxinas estimulam a acidificação da parede celular permitindo sua extensão ou alongamento e, durante este processo de crescimento, a célula absorve grandes quantidades de água (Raven *et al.* 2001; Silveira *et al.* 2004). Estes fatores poderiam explicar a quantidade de água absorvida pelas células que foi observado comparando-se os gráficos de massa fresca e massa seca (%) em que os calos friáveis apresentaram baixo teor de matéria seca em comparação aos calos compactos, indicando que, possivelmente, os calos friáveis absorveram teores de água superiores aos calos compactos.

5.2. Compostos de reserva

O crescimento de culturas embriogênicas geralmente é marcado por mudanças de síntese e mobilização de proteínas, carboidratos e lipídeos. E o estudo dos aspectos bioquímicos do ciclo celular pode levar a uma melhor compreensão da indução e desenvolvimento da embriogênese somática (Silveira *et al.* 2004).

5.3. Carboidratos solúveis totais

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a quantidade de carboidratos acumulada, em especial nos calos do tipo friável, é elevada em comparação aos resultados obtidos por Ori (2006). Este estudo visava quantificar carboidratos solúveis totais em primórdios de brotos de *Phalaenopsis amabilis* Lindl. induzidos com o acréscimo de 2,4-D (0,16 mg L⁻¹). Os maiores teores de carboidratos solúveis totais

foram observados aos 30 dias de cultura com os açúcares solúveis atingindo concentrações superiores a 200 mg g⁻¹ de massa seca, valor menor em comparação ao maior observado no presente trabalho com *S. spectabilis* (calo friável no tratamento 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D com aproximadamente 400 mg g⁻¹ de massa seca). A condição de cultura *in vitro* é considerada estressante, pelas altas concentrações de sais nos meios de cultura, espaço restrito e alta umidade (Pospíšilová *et al.* 1999). Devido a este fato sugere-se que as células em crescimento acumularam altos teores de carboidratos para auxiliar seu crescimento ao longo do período de cultivo *in vitro*. Segundo Thompson *et al.* (2008) plantas sob estresse produzem quantidades adequadas de assimilados para dar suporte ao crescimento, porém acumulam grandes quantidades de sacarose nos tecidos imediatamente após o estresse além do papel da sacarose como agente regulador da osmolaridade intracelular, evitando a perda excessiva de água pelos tecidos vegetais.

Observou-se que calos do tipo oxidado apresentaram maior concentração de carboidratos solúveis em relação ao teor de amido. Isto provavelmente se deve ao fato de as células estarem em processo de senescência sugerindo que o carboidrato de reserva amido estavam sendo consumidos somente no processo respiratório, interrompendo a fase de multiplicação.

5.4. Proteínas Solúveis

A quantificação de proteínas solúveis totais (figura 13) indicou concentrações expressivas nos calos cultivados neste trabalho em comparação ao trabalho de Silveira *et al.* (2004) em que o maior valor obtido pela quantificação de proteínas solúveis totais em cultura de suspensão celular de *Pinus taeda* L. foi de 0,73 mg g⁻¹ da massa fresca (estimando 10% deste valor para massa seca). Estes mesmos autores sugerem que o aumento na concentração deste tipo de proteínas pode estar relacionado à atividade mitótica durante a fase de crescimento exponencial. O início do ciclo celular apresenta uma biossíntese de várias proteínas específicas que levam a diversas mudanças morfológicas e bioquímicas durante toda a atividade mitótica. Cangahuala-Inocente *et al.* (2004) sugeriram que a presença destas proteínas específicas em células embriogênicas pode estar associada à formação de grupos pró-embriogênicos. Segundo Serra *et al.* (2000), o aumento do teor de proteína, coincide com a fase *lag* (início da

multiplicação) da curva de crescimento de calos da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). Essa elevação expressa a síntese de novas proteínas formadas a partir da fase de degradação de carboidratos, na qual é necessária à produção de energia que será utilizada na fase exponencial de crescimento, onde ocorre uma maior taxa de divisão celular.

5.5. Amido

As concentrações de amido observadas foram inferiores às aquelas observadas para proteínas e carboidratos solúveis totais. Entretanto, elas foram superiores às observadas por Silveira *et al.* (2004) em cultura de suspensão de células de *Pinus taeda*, com a maior concentração observada de 15,53 mg g⁻¹ massa fresca (estimando 10% deste valor para massa seca). Contudo Ori (2006) observou em primórdios de brotos de *Phalaenopsis amabilis* Lindl. cultivados sob 2,4-D, quantidades superiores de amido em relação às aquelas observadas no presente trabalho (máximo de 200 mg g⁻¹ de massa seca no tratamento de 0,16 mg L⁻¹). Segundo Rodriguez & Wetzstein (1998) a formação de protuberâncias embriogênicas em *Carya illinoensis* (Wangenh.)K. Koch. é precedida pelo acúmulo de grãos de amido, e este é rapidamente consumido durante a formação destas regiões, entretanto durante as fases de maturação do embrião (fase coração e torpedo), o amido está ausente.

Observando-se os valores de amido dos calos friáveis e nodulares de *S. spectabilis* cultivados sob o tratamento 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foi possível inferir que a quantidade de amido observada foi sintetizada a partir da sacarose do meio de cultura. A sacarose do meio pode entrar nas células por duas rotas, na maioria das células entra por difusão através dos plasmodesmata por transporte simplástico. Nesse caso a sacarose é degradada no citossol ou sequestrada no vacúolo para manter o transporte passivo. No entanto, em alguns tecidos, a sacarose precisa atravessar a membrana plasmática, muitas vezes contra o gradiente de concentração. Ela pode ser transportada inalterada ou convertida em glicose e frutose por uma invertase localizada na parede celular. Existem duas formas de invertase, uma com pH ótimo ácido, sendo a outra mais ativa em condições alcalinas. Estas atuam em diferentes compartimentos celulares: invertase alcalina no citossol e invertase ácida no vacúolo e parede celular. É provável que a

sacarose armazenada no vacúolo seja hidrolisada dentro desse compartimento e, as hexoses livres resultantes, transportadas para o citossol. A invertase de parede celular está firmemente ligada aos componentes da matriz da parede (Dennis & Blakeley 2000).

Nos amiloplastos o carbono utilizado para a síntese do amido deve ser importado do citossol. A princípio acreditava-se que o transporte de carbono se dava pelo transportador triose-fosfato, mas experimentos comprovaram que moléculas intactas de hexoses eram transferidas diretamente para os plastos (Dennis & Blakeley 2000).

5.6. Somatória dos compostos de reserva analisados

Foi possível observar que houve acúmulo de compostos de reserva pelos calos de *S. spectabilis* cultivadas nos tratamentos com 2,4-D, sendo todos com concentrações superiores a 100 mg g⁻¹ de massa seca. Sugere-se que a indução de multiplicação provocada por esta auxina sintética esteja também conduzindo as células a acumular os compostos, pois o processo de divisão celular exige uma grande demanda de energia e compostos básicos para a duplicação de DNA, síntese protéica específica, multiplicação de organelas e produção de novas paredes celulares. Desse modo, é possível inferir que os tratamentos com 0,12 e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, apresentando os maiores valores de compostos de reserva, representam as melhores concentrações desta auxina para induzir a multiplicação celular em calos de *Senna spectabilis*. Sendo que nos calos nodulares cultivados sob o tratamento de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D foi observado maior teor de proteínas totais solúveis e nos calos friáveis cultivados sob o tratamento 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D maior teor de carboidratos solúveis. Entretanto, o tratamento 10 mg L⁻¹ de 2,4-D representou a melhor opção para a indução calos friável e nodular com maior acúmulo de amido.

Os tratamentos com menores concentrações de 2,4-D (0,12; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) favoreceram o acúmulo geral de compostos de reserva em relação aos outros tratamentos. Com o aumento da concentração, os valores destes compostos foram diminuindo, com exceção do calo tipo friável cujo acúmulo de compostos aumentou a partir do tratamento 10 mg L⁻¹ de 2,4-D.

O ponto de verificação e checagem da fase G1 do ciclo celular em que a concentração de sacarose, auxina e citocinina do explante atuam no controle da divisão celular foi outro aspecto de interesse a destacar. Sabe-se que se não houver um tamanho adequado da célula a dividir, concentrações adequadas de carboidratos e nutrientes além dos fatores indutores (temperatura e reguladores de crescimento) para dar início à divisão celular, a célula deverá cessar as atividades relacionadas à multiplicação até que estas condições sejam atingidas (Raven *et al.* 2001). Embora os compostos de reserva observados possivelmente apresentassem teores favoráveis à divisão e crescimento celular além da presença de auxinas em diferentes concentrações e sacarose no meio de cultura, não foi possível induzir a formação de embriões somáticos nem gemas ou raízes, indicando que outros fatores necessários para a diferenciação no ponto de checagem da fase G2 estavam ausentes ou em baixas concentrações durante o experimento. Entretanto, os dados obtidos neste trabalho servirão como base para que novos protocolos de propagação e diferenciação de *Senna spectabilis* sejam desenvolvidos.

5.7. Espectralina

A presença de espectralina nos calos cultivados ocorreu de forma aleatória, em vários tipos de calos, e em quantidades mínimas nos tratamentos com 2,4-D, exceto o de 40,0 mg L⁻¹ onde o composto secundário não foi encontrado. A existência de espectralina nos diferentes calos indica o seu potencial de biossíntese deste composto secundário em culturas *in vitro*. De acordo com Shrivastava *et al.* (2006), a composição química do meio de cultura, os reguladores de crescimento e os componentes físicos da cultura axênica possuem papel importante na indução da biossíntese dos constituintes químicos das células cultivadas *in vitro*.

As células vegetais são totipotentes e todo o potencial genético e fisiológico necessário para a produção de metabólitos secundários está presente em uma célula isolada. Segundo esta constatação, espera-se que as células cultivadas *in vitro* obtidas a partir de qualquer parte da planta produzam metabólitos secundários semelhantes aos da planta cultivada *in vivo*. A incapacidade de fazer isso, de certa forma está ligada ao nível e ao grau de diferenciação necessários para a expressão dos genes associados com o metabolismo secundário (Brown & Charlwood 1986).

6. Considerações Finais

Todos os fragmentos de órgãos utilizados (hipocótilo, epicótilo, folhas primárias e cotilédones) apresentaram competência para receber o estímulo da auxina e iniciar a desdiferenciação, multiplicação celular e produção de diferentes tipos de calos.

A formação de calos compactos ocorreu em todos os tratamentos, mas a formação de calos tipo nodular não foi constante. Os dados sugerem que parte dos calos oxidados, presentes nos tratamentos 0,12; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, sejam de origem friável. Não houve formação dos calos com aparência leitosa descritos por Pal *et al.* (2005) como competentes para prosseguir a embriogênese somática.

O teor de carboidratos foi maior no tratamento 0,12 mg L⁻¹ (2,4-D), o maior valor para teor de proteínas foi observado nos calos nodulares cultivados sob o tratamento 0,5 mg L⁻¹ (2,4-D) e, para amido 10 mg L⁻¹ (2,4-D). O tratamento observado como mais adequado, de acordo com os valores máximos obtidos para os compostos de reserva, foram o tratamento 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D para os calos friáveis seguido do tratamento 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D para calos do tipo nodular.

A produção de espectralina ocorreu em quantidade mínima nos diferentes tipos de calos nas diversas concentrações de 2,4-D, exceto em 40 mg L⁻¹ (não detectado), indicando ser um composto secundário possivelmente constitutivo nos calos induzidos. Outros explantes iniciais, tais como inflorescências onde obtiveram quantidades expressivas de alcalóides, são sugeridos para estudos de avaliação do potencial para a produção de compostos secundários de interesse.

Os dados obtidos indicam que um choque de auxina (10 mg L⁻¹ de 2,4-D) em fragmentos de hipocótilo por curto período (máximo de 5 dias) para indução de multiplicação e de acúmulo de amido, seguido de cultivo com 0,12 ou 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D para incremento da massa vegetal e acúmulo dos demais compostos de reserva (carboidratos e proteínas solúveis totais), conduziria à produção de calos friáveis ou nodulares adequados para o estabelecimento do ciclo de multiplicação da cultura de tecido, permitindo posteriormente novos tratamentos para diferenciação de outros órgãos vegetais.

7. Conclusões

(1) Foi possível estabelecer metodologia de calogêneses de *S. spectabilis* adicionando-se 2,4-D ao meio de cultura e inoculando-se fragmentos de folhas, cotilédones, hipocótilo e epicótilo.

(2) A concentração de 0,12 mg L de 2,4-D apresentou calos friáveis com maiores teores de carboidratos solúveis; a concentração de 0,5 mg L de 2,4-D apresentou calos nodulares com maiores teores de proteínas solúveis e a concentração de 10 mg L de 2,4-D apresentou calos friáveis com maior teor de amido.

(3) Foi detectada a substância espectralina nos calos cultivados, porém em quantidades muito pequenas e economicamente inviáveis.

8. Resumo

Senna spectabilis (DC) Irwin et Barn (sin *Cassia spectabilis*), família Leguminosae, popularmente conhecida como cássia-carnaval, são-jão ou canafístula-de-besouro, é uma árvore ornamental, decídua, heliófita, seletiva xerófita, nativa do Brasil. Atinge entre 6 e 9 metros de altura, apresentando folhas compostas e pinadas, flores amarelas durante os meses de dezembro a abril e frutificação, de agosto a setembro. É muito utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades e artigos científicos utilizando os extratos *S. spectabilis* ressaltaram a sua ação antitumoral e anticolinérgica. Grupos de pesquisa isolaram vários alcalóides de estruturas singulares dessa espécie e comprovaram, por meio de bioensaios, que estas substâncias são as responsáveis pelo caráter medicinal da planta e dentre os compostos isolados, destacou-se a espectralina.

Levando em consideração as propriedades farmacológicas desta espécie e a necessidade de um estudo base para o crescimento *in vitro* da planta, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de propagação vegetativa, identificar a produção de espectralina pelas células multiplicadas *in vitro*, quantificar os carboidratos (solúveis totais e amido) e proteínas solúveis presentes na indução de explantes em cultura de tecido e correlacionar com as concentrações de 2,4-D exógeno.

Sementes retiradas de frutos maduros de espécime de *S. spectabilis* proveniente do Instituto de Botânica, São Paulo, após desinfestação com ácido sulfúrico concentrado, foram germinadas *in vitro* em meio de cultura MS acrescido de vitamina B5, 3% de sacarose, ágar bacteriológico e pH 5,8. As plântulas obtidas tiveram seus órgãos seccionados e inoculados em meio MS contendo a auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; concentrações de 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5; 10; 20; 40 mg L⁻¹) e mantidas em sala de cultura onde permaneceram até a calogênese. Os calos formados foram classificados (friável, nodular e compacto) e congelados após medida de massa fresca, para posterior liofilização e obtenção de massa seca. Para a extração dos carboidratos solúveis totais foi adicionado etanol 80% ao material seco e homogeneizado. O resíduo foi utilizado para extração de proteínas solúveis adicionando-se tampão fosfato ao mesmo. A extração de amido foi feita adicionando-se ácido perclórico 52% ao resíduo obtido da extração protéica. A quantificação, em triplicata, de amido e carboidratos totais foi realizada pelo método fenol-sulfúrico e os teores de proteínas foram quantificados pelo método do corante Coomassie-Blue. O extrato etanólico concentrado também foi utilizado para

identificação de espectralina. O padrão de espectralina foi obtido pela extração etanólica de aproximadamente 500g de massa fresca, congelada, liofilizada e pulverizada de flores de *S. spectabilis* colhidas no Instituto de Botânica. Os extratos etanólicos foram concentrados, congelados, liofilizados e, após determinação de sua massa seca, os extratos foram hidrolisados com ácido sulfúrico 5% por 16 horas, sendo adicionado hexano para a retirada de lipídeos, e posteriormente as frações ácidas foram basificadas com hidróxido de amônia e realizou-se partição líquido-líquido com diclorometano. A fração de diclorometano foi retirada e evaporada, até atingir seu estado cristalizado, sendo armazenada a 4 °C. Essa fração de alcalóides foi analisada em cromatógrafo a gás Varian Chrompack CP-3380, com detector de ionização de chama (FID), gás de arraste hélio, e coluna Supelco SPB-1 (30m X 0,25mm), com injeção de 1µl da amostra na concentração de 4,0 mg.ml⁻¹ em acetato de etila.

Os resultados obtidos indicam que o tratamento com 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D induziu calos com melhores condições para realizar estudos de propagação e de desenvolvimento vegetativo pois estes apresentaram maiores concentrações de compostos de reserva. Os calos friáveis do tratamento continham 400 mg g⁻¹ MS de carboidratos solúveis totais, 112 mg g⁻¹ MS de proteínas solúveis totais e 10 mg g⁻¹ MS de amido. Já o tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentou calos oxidados com os menores valores de compostos, apresentando 92 mg g⁻¹ MS de carboidratos solúveis, 22 mg g⁻¹ MS de proteínas solúveis e 1,4 mg g⁻¹ MS de amido.

Os hipocótilos e epicótilos produziram maior quantidade de calos quando submetidos ao tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, apresentando acima de 80% de calogênese, já as folhas e cotilédones responderam melhor com 2,5 mg L⁻¹ com 70% de formação de calos e o controle (ausência de auxina) apresentou os menores valores, abaixo de 30% de indução de calos. Os tratamentos de menores concentrações de 2,4-D (0,12; 0,25; 0,5 mg L⁻¹) apresentaram maior incidência de oxidação, com grandes perdas na viabilidade destes explantes.

A produção de espectralina foi observada em quantidade mínima nos diferentes tipos de calos nas diversas concentrações de 2,4-D, exceto em 40 mg L⁻¹ (não detectado), indicando ser um composto secundário possivelmente constitutivo nos calos induzidos, porém inviável para a produção comercial.

Os dados obtidos indicam que um choque de auxina (10 mg L⁻¹ de 2,4-D) em fragmentos de hipocótilo por curto período (máximo de 5 dias) para indução de multiplicação e seu acúmulo de amido, seguido de cultivo com 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D para incremento da massa vegetal e acúmulo dos demais compostos de reserva (carboidratos e proteínas solúveis), possibilita a produção de calos friáveis adequados para o estabelecimento do ciclo de multiplicação da cultura de tecido.

9. Abstract

Senna spectabilis (DC) Irwin et Barn (sin *Cassia spectabilis*), family Fabaceae, commonly known as “cassia-carnaval”, “são-joão” or “canafistula-de-besouro”, is an ornamental tree, deciduous, heliophytic, xerophytic, native of Brazil. The tree can reach 6 and 9 meters high, with compound-pinnate leaves, blooming yellow flowers from December to April and fruiting from August to September. It is widely used in folk medicine for the treatment of various diseases. Scientific articles conducted with extracts of *S. spectabilis* highlighted the anti-cancer and the anticholinesterasic potential activity of this species. Research groups have isolated several alkaloids of unique structures and proved by bioassays, that these substances are responsible for the medicinal feature of this plant and among the isolated compounds, the alkaloid spectralin was observed.

Considering the pharmacological properties of this species and the need of a baseline study for *in vitro* plant development, the purpose of this work was to develop a method of vegetative propagation, identify the production of spectralin on cells multiplied *in vitro*, quantify the storage compounds (soluble carbohydrate, soluble protein and starch) stored in induction culture of explants and correlated with the exogenous auxin concentrations.

Seeds from ripe fruit of *S. spectabilis* from the Instituto de Botânica, State of São Paulo, after being disinfected with concentrated sulfuric acid were germinated *in vitro* on MS medium plus B5 vitamin, 3% sucrose, 0.8% bacteriological agar, and pH 5.8. Plantlets were dissected and inoculated on MS medium containing the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; concentrations of 0.0, 0.12, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg L⁻¹) and maintained in culture room remaining until callus induction. The calli were classified (friable, nodular and compact), and frozen after measure of fresh weight following lyophilization and dry matter determination. For the extraction of soluble carbohydrates 80% ethanol was added to the dry material and pulverized. The residue was used for extraction of soluble proteins by adding phosphate buffer. The extraction of starch was made by adding 52% perchloric acid to the residue obtained from the protein extraction. The quantification, in triplicate, of starch and total carbohydrates was performed by phenol-sulfuric method and protein was quantified by the method of Coomassie-Blue dye. The concentrated ethanol extract was also used to identify spectralin. The spectralin standard was obtained by ethanolic extraction of 500 g of fresh, frozen, freeze-dried and powdered flowers of *S. spectabilis* collected at the Instituto de Botânica. The ethanol extracts were concentrated, frozen, dried and, after dry weight determination, the extracts were hydrolyzed with 5% sulfuric acid for 16 hours, added hexane for removal of lipids,

and the acid fractions were alkalized with hydroxide ammonia and held liquid-liquid partition with dichloromethane. The dichloromethane fraction obtained was removed and evaporated, until it reached crystalline state, and stored at 4°C. This alkaloid fraction was analyzed on gas chromatograph Varian Chrompack CP-3380 with detector flame ionization (FID), carrier gas helium, and column Supelco SPB-1 (30m X 0,25 mm), with injection of the 1.0 µL sample at a concentration of 4.0 mg.mL⁻¹ in ethyl acetate.

The results indicate that treatment with 0,12 mg L⁻¹ of 2,4-D induced callus with better condition to conduct studies of propagation and vegetative growth due the higher concentrations of reserve compounds. The friable callus in these treatment presented 400 mg g⁻¹ dry matter of soluble carbohydrates, 112 mg g⁻¹ dry matter of soluble proteins and 10 mg g⁻¹ dry matter of starch. However treatment with 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D showed callus oxidized with lower contents of reserve compounds, with 92 mg g⁻¹ dry matter of carbohydrates, 22 mg g⁻¹ dry matter of soluble proteins and 1.4 mg g⁻¹ dry matter of starch.

The hypocotyl and epicotyl produced larger amount of callus at 0,5 mg L⁻¹ of 2,4-D treatment presenting 80% of callus formation. The leaves and cotyledons responded better under 2.5 mg L⁻¹ with 70% of callus formation and the control (absent of auxin) had the lowest values below 30%. The treatments of lower concentrations of 2,4-D (0.12, 0.25, 0.5 mg L⁻¹) had a higher incidence of oxidation, with large losses in the explants viability.

Spectalin production was observed in very low concentrations in different types of calli and different concentrations of 2,4-D, except at 40.0 mg L⁻¹ (not detected), indicating that this secondary compound possibly was a constitutive compound in induced callus.

The data indicate that an auxin shock (10.0 mg L⁻¹ of 2,4-D) in hypocotyl fragments for a short-term treatment (up to 5 days) to induce the proliferation and accumulation of starch, followed by cultivation with 0.12 mg L⁻¹ 2,4-D to increase in plant mass and accumulation of other storage materials (soluble carbohydrate and proteins), enables the production of friable callus suitable for the establishment of the multiplication cycle of tissue culture.

10. Referências Bibliográficas

- Agrawal, V. & Sardar, P.R.** 2006. *In vitro* propagation of *Cassia angustifolia* through leaflet and cotyledon derived calli. *Biologia Plantarum* 50: 118-122.
- Anjaneyulu, C. & Giri, C.C.** 2008. Factors influencing somatic embryo maturation, high frequency germination and plantlet formation in *Terminalia chebula* Retz. *Plant Biotechnology* 12: 153-161.
- Arteca, R.N.** 1996. Plant growth substances – principles and applications, 1 ed, Chapman, New York.
- Aslam J., Mujib A., Fatima S. & Sharma M.P.** 2008. Cultural conditions affect somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. *Plant Biotechnology Report* 2: 179-189.
- Asseleih, L.M.C., Hernandez, O.H. & Sanchez, J.R.** 1990. Seasonal variations in the content of sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula* populations. *Phytochemistry* 29: 3095-3099.
- Avigad, G.A.** 1982. Sucrose and other disaccharides *In*: F.A. Loewus & W. Tanner (eds). *Plant Carbohydrates. I. Intracellular Carbohydrates*. Springer- Verlag, Berlin, 217-357.
- Benjamins, R. & Scheres, B.** 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59: 443-465.
- Bolzani, V.S., Gunatilaka, A.A.L. & Kingston, D.G.I.** 1995. Bioactive piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. *Tetrahedron* 51: 5929.
- Braga, R.** 1982. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 4 ed, Imprensa Oficial, Fortaleza, pp.540.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-252.
- Brown, J.T. & Charlwood, B.V.** 1986. Differentiation and monoterpene biosynthesis in plant cell cultures. *In*: P. Morris, A.H. Scragg, A. Stafford & M.W. Fowler (eds). *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 68-74.

- Bruneau, A., Forest, F., Herendeen, P.S., Klitgaard, B.B. & Lewis, G.P.** 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany* 26: 487-514.
- Campanoni, P. & Nick P.** 2005. Auxin dependent cell division and cell elongation 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* 137: 939-948.
- Cangahuala-Inocene, G., Steiner, N. & Guerra, M.P.** 2004. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224: 33-40.
- Catarina, C.S., Randi, A.M. & Viana, A.M.** 2003. Growth and accumulation of storage reserves by somatic embryos of *Ocotea catarinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 67-71.
- Chen, Y., Liu, X., Liu, Y.** 2005. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 247-251.
- Chukeatirote, E., Hanpattanakit, P., Kaprom, A. & Tovanont, J.** 2007. Antimicrobial activity of *Senna spectabilis* and *S. tora*. *Journal of Plant Sciences* 1: 123-126.
- Custódio, L., Martins-Loução, M.A. & Romano, A.** 2004. Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum* 48: 469-472.
- Dennis, D.T. & Blakeley, S.D.** 2000. Carbohydrate metabolism. *In*: B.B. Buchanan; W. Gruissem & R.L. Jones (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Doerner, P.** 2000. Cell division regulation. *In*: B.B Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Dubois, M., Gille, K.A., Hamilton, J.K., Reber, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Elavumootil, O.C., Martin, J.P. & Moreno, M.L.** 2003. Changes in sugars, sucrose synthetase activity and proteins in salinity tolerant callus and cell suspensions cultures of *Brassica oleracea* L. *Biologia Plantarum* 46: 7-12.
- Finner, J.J.** 1994. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. *In*: R.A. Dixon & R.A. Gonzales (eds). *Plant Cell Culture. A practical Approach* 2 ed. IRL Press, Oxford, 116-117.

- Finner, J.J.** 1995. Direct somatic embryogenesis. *In*: O.L. Gamborg & G.C. Philips (eds). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods. Springer-Verlag, Berlin, pp.358.
- Franklin, C.I. & Dixon, R.A.** 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. *In*: R.A. Dixon & R.A. Gonzales (eds). Plant Cell Culture. A practical approach, 2 ed. IRL Press, Oxford, pp.230.
- Foyer, C.H., Ferrario-Méry, S. & Huber, S.C.** 2000. Regulation of Carbon Fluxes in the cytosol: Coordination of sucrose synthesis, nitrate reduction and organic acid and amino acid biosynthesis. *In*: R.C. Leegood, T.D. Sharkey & S. Caemmerer (eds). Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Academic Publishers, Netherlands, pp.624
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gamborg, O.L. & Phillips, L.G.C.** 1995. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods. Springer-Verlag, Berlin.
- Garrity, D.P. & Mercado, A.R.** 1994. Nitrogen fixation capacity in the component species contour hedge grows. How important? *Agroforestry Systems* 22: 207-220,
- Gharyal, P.K. & Maheshwari, S. C.,** 1990. Differentiation in explants from mature leguminous trees. *Plant Cell Reports* 8: 550-553
- George, E.F.** 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Exegetics Limited, Edington, pp.575-1361.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.D.** 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol I. The Background. 3 ed. Springer, Dordrecht, pp.508.
- Gilman, E.F. & Watson, D.G.** 1994. Fact Sheet ST-588 Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville FL 32611.
- Godoy-Hernández, G. & Vazquez-Flota, F.A.** 2006. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. *In*: G. Godoy-Hernández & F.A. Vazquez-Flota (eds). Plant Cell Cultures Protocols. 2 ed. Humana Press Inc. New Jersey, Totowa, pp.416.
- Grospietsch, M., Lipavská, H. & Opartná, J.** 2000. Effect of paclobutrazol on soluble sugars and starch content on *de novo* regenerating potato stem explants. *Biologia Plantarum* 43: 137-139.

- Hauser, S.** 2006. Crop rotation with planted *Senna spectabilis*. Conference on International Agriculture Research for Development, University of Bonn & IITA.
- Helmreich, E.J.M.** 2001. The biochemistry of cell signaling, Oxford University Press, Oxford, pp.325.
- Herendeen, P. S., Gwilym, P. L., Bruneau, A.** 2003. Floral morphology in Caesalpinioideae legumes: testing the monophyly of the “Umtiza clade”. International Journal of Plant Sciences 165: 393-407.
- Hildebrandt, A.C., Wilmar, J.C., Johns, H. & Riker, A.J.** 1963. Growth of edible chlorophyllous plant tissue *in vitro*. American Journal of Botany 50: 248-254.
- Huey, R.B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A. & Kingsolver, J.G.** 2002. Plant versus animals: do they deal with stress in different ways? Integrative and Comparative Biology 42: 415-423.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., Gvetoslavova, S., Evtimova, M. & Atanasov, A.** 2005. Somatic embryogenesis of the model legume *Medicago trunculata* and other diploid medics. Biotechnology & Biotechnology eq. 19, special Issue.
- Irwin, H.S. & Barneby, R.C.** 1982. The american Cassiinae. Memoirs of the New York Botanical Garden 35: 1-918.
- Jeller, H. & Perez, S.C.J.G.A.** 2001. Efeito dos estresses hídrico e salino e da ação da giberelina em sementes de *Senna spectabilis*. Ciência Florestal 11: 93-104.
- Jiménez, V.M.** 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira Fisiologia Vegetal 13:196-223.
- Kamo, T., Machara, K., Sato, K. & Hirota, M.** 2003. Spectamines A and B, possible inhibitors of superoxide anion production of macrophages from *Cassia spectabilis*. Heterocycles 60: 1303-1306.
- Kitanaka, S. & Takido, M.** 1994. (S)-5,7'-biphyscion 8-glucoside from *Cassia torosa*. Chemical Pharmacology Bulletin 42: 717-718.
- Konieczny, R., Czaplicki, A.Z., Golczyk, H. & Przywara, L.** 2003. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 117-187.
- Laca-Buendia, J.P.** 1989. Efeito de reguladores de crescimento no algodoeiro (*Gosypium hirsutum* L.). Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 1: 109-113.
- Lindigkeit, L., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H.M., Bopré, M. & Hartmann, T.** 1997. The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its

- N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* 245: 626-636.
- Lorenzi, H.** 1998. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 1, 2 ed. Plantarum, Nova Odessa, pp.167.
- Loyola-Vargas, V.M. & Vazquez-Flota, F.** 2006. Plant cell cultures protocols. 2 ed. Humana Press Inc. New Jersey, Totowa.
- Krieken, W. M., Kodde, J., Visser, M. H. M., Tsardakas, D., Blaakmeer, A., Groot, K. de, Leegstra, L.** 1997. Increased induction of adventitious rooting by slow release auxins and elicitors. *In: A. Altman & Y. Waisel (eds.) Biology of root formation and development.* Plenum Press, New York, pp. 376.
- Krikorian, A. D., Kelly, K., Smith, D. L.N.** 1988. Hormones and somatic embryogenesis. *In: Davies, P.J.(ed) Plant hormones and their role in plant growth and development* Kluwer Academic Publishers. Dordriech pp.635.
- Machuka J., Adesoye A. & Obembe O.O.** 2002. Regeneration and genetic transformation in cowpea. *In: C.A. Fatokun CA, S.A. Tarawali SA, B.B. Singh, P.M. Kormawa & M. Tamo (eds.) Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, 4-7 September 2000, Regeneration and genetic transformation in cowpea. Biotechnology for Cowpea, 185-196*
- Macleane, R.H., Litsinger, J.A., Moody, K. & Watson, A.K.** 1992. The impact of alley cropping *Gliricidia sepium* and *Cassia spectabilis* on upland rice and maize production. *Agroforestry Systems* 20: 213-228.
- Marazzi, B., Endress, P K. Queiroz, L.P. & Conti, E.** 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectarines. *American Journal of Botany* 93: 288-303.
- Mendez, A. M.** 1971. Aliphatic alcohols, β -sitosterols and alkaloids in *Cassia jahnii*. *Phytochemistry* 10: 2255-2256.
- Mikula, A., Fiuk, A. & Rybczynski, J.J.** 2005. Induction, maintenance and preservation of embryogenic competence of *Gentiana cruciata* L. cultures. *Acta Biologica Cracoviensa, Series Botanica* 47: 227-236.

- Mishra, M., Saxena, R.P., Pathak, R.K. & Srivastava, A.K.** 1999. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). *Progressive Horticulture* 31: 116-122.
- Moreira, M.S.A., Viegas Jr., C., Miranda, A.L.P., Barreiro, E.J. & Bolzani, V.S.** 2003. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. *Planta Medica* 69: 795-799.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-496.
- Oliveira, P.D. de, Pasqual, M., Lopes, P.A. & Oliveira, P.D.** 1994. Efeito de citocininas e auxinas sobre a formação de calos em culturas *in vitro* de anteras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Eriparza. *Revista Ceres* 41: 651-657.
- Ori, S. S.** 2006. Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro*. Instituto de Botânica de São Paulo, pp.133.
- Osborne, D.J. & MacManus, M.T.** 2005. Hormones, signals and target cells in plant development. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pal, S.P., Alam, I., Anisuzzaman, M., Sarker, K.K., Sharmin, S. & Alam, M.F.** 2006. Indirect organogenesis in summer squash (*Curcubita pepo* L.). *Turkish Journal of Agriculture Forestry*. 31: 63-70.
- Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp.348.
- Pivatto, M., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Castro-Gamboa, I., Rezende, A., Viegas Jr, C., Young, M.C.M., Furlan, M. & Bolzani, V.S.** 2005. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16: 1431-1438.
- Phillips, G.C., Hubstenberger, J.F. & Hansen, E.E.** 1995. Plant regeneration from callus and cell suspension cultures by somatic embryogenesis. In: O.L. Gamborg & G.C. Phillips (eds). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer-Verlag, Berlin.
- Pospíšilová J., Tichá, I. Kadleček, P. Haisel D. & Plzáková, Š.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.

- Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E. & Gutierrez, C.** 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173-183.
- Raemakers, K., Pereira, I., Koehorst van Putten, H. & Visser, R.** 2006. Indirect somatic embryogenesis in cassava for genetic modification purposes. *In*: V.M. Loyola-Vargas & F. Vazquez-Flota (eds). *Plant Cell Cultures Protocols*. 2 ed. Humana Press Inc. New Jersey, Totowa.
- Randell, B.R. & Barlow, B.A.** 1998. *Senna*. *Flora of Australia* 12: 89-138.
- Raven P H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2001. *Biologia Vegetal*. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rodriguez, A.P.M., Wetzstein, H.Y.** 1998. A morphological and histological comparsion of the initiation development of Pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, 204:71-83.
- Samy, R.P., Ignacimuthu, S. & Sen, A.** 1998. Screening of 34 indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 173-182.
- Samy, R.P. & Ignacimuthu, S.** 2000. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in western Ghats of India. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 63-71.
- Sangetha, S., Zurainia Z., Suryania S. & Sasidharan S.** 2009. *In situ* TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron* 40: 439-443.
- Serra, A.G.P., Paiva, R. & Paiva, P.D.O.** 2000. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) *Ciência e Agrotecnologia* 24: 833-840.
- Sharp, W.R., Sohndhal, M.R., Evans, A.E., Caldas, L.A. & Maraffa, S.B.** 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2: 268-310.
- Shimura, H. & Koda, Y.** 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm like bodies derive from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 273-276.
- Shrivastava N., Patel T. & Srivastava A.** 2006. Biosynthetic potential of *in vitro* grow callus cells of *Cassia senna* L. var *senna*. *Current Science* 90: 1472-1473.
- Silva, M.** 2009. Comunicação Pessoal, Instituto de Botânica de São Paulo.
- Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W. & Guerra, M.P.** 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracelular protein, starch and

polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 53-60.

- Stasolla, C.** 2006. Somatic embryogenesis in *Picea* suspension cultures. In: V.M. Loyola-Vargas & F. Vazquez-Flota (eds). Plant Cell Cultures Protocols, Second Edition, Humana Press Inc. New Jersey , Totowa.
- Thompson, A.L., Love, S.L., Sowokinos, J.R., Thornton, M.K. & Shock, C.C.** 2008. Review of the sugar end disorder in potato (*Solanum tuberosum* L.). American Journal of Potato Research 85: 375-386.
- Tu, M., Hurd, C. A. , Randall, J.M.** 2001. Weed control methods handbook: the nature conservancy. <http://tncweeds.ucdavis.cdu>, version april 2001.
- Viegas Jr, C., Bolzani, V.S., Barreiro, E.J. & Miranda, A.L.P.** 2003. *Resumos da 26^a* Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil.
- Viegas, Jr. C., Bolzani, V.S., Furlan, M., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Tomazela, D. & Eberlin, M.N.** 2004. Further bioactive piperidine alkaloids from the flower and green fruits of *Cassia spectabilis*. Journal of Natural Products 67: 809-910.
- Viegas, Jr. C., Rezende, A., Silva, D.H.S., Castro-Gambôa, L. & Bolzani, V.S.** 2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. Química Nova 29: 1279-1286.
- Willadino, L., Pereira, J.S. & Câmara, T.R.** 2001. Ajuste de protocolo para micropropagação de variedades selecionadas de acerola. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais do XVII CBF – Propagação, Jaboticabal - UFPel.
- Zhou, S. & Brown, D.C.W.** 2006. High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. Plant Cell Reports 25: 166-173.

Anexos

Dados Estatísticos de massa fresca dos diferentes tipos de calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D de obtidos pelos testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer, considerando como significativas diferenças com $p < 0,05$.

Anexo 1

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0,0021, considered very significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.873 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
friavel vs nodular	17.806	4.488 *	P<0,05
friavel vs compacto	22.338	5.631 **	P<0,01
friavel vs oxidado	19.738	4.975 **	P<0,01
nodular vs compacto	4.533	1.183 ns	P>0,05
nodular vs oxidado	1.933	0,5042 ns	P>0,05
compacto vs oxidado	-2.600	0,6784 ns	P>0,05

Dados Estatísticos do teor de massa seca dos diferentes tipos de calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D de obtidos pelos testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer, considerando como significativas diferenças com $p < 0,05$

Anexo 2

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0,0083, considered very significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.977 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
=====			
friavel vs nodular	-1.468	1.191	ns $P > 0,05$
friavel vs compacto	-5.834	5.061	** $P < 0,01$
friavel vs oxidado	-0,6053	0,4011	ns $P > 0,05$
nodular vs compacto	-4.366	3.788	ns $P > 0,05$
nodular vs oxidado	0,8623	0,5714	ns $P > 0,05$
compacto vs oxidado	5.229	3.619	ns $P > 0,05$

Dados Estatísticos dos teores de carboidratos solúveis totais (mg g⁻¹ de massa seca) nos diferentes calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D de obtidos pelos testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer, considerando como significativas diferenças com p<0,05

Anexo 3

calo friável

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.225 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0 vs t0,12	-309.32	15.111 ***	P<0,001
t0 vs t2,5	56.323	3.891 ns	P>0,05
t0 vs t5	25.802	1.783 ns	P>0,05
t0 vs t10	52.206	3.607 ns	P>0,05
t0 vs t40	-142.86	9.869 ***	P<0,001
t0,12 vs t2,5	365.65	17.862 ***	P<0,001
t0,12 vs t5	335.13	16.371 ***	P<0,001
t0,12 vs t10	361.53	17.661 ***	P<0,001
t0,12 vs t40	166.47	8.132 ***	P<0,001
t2,5 vs t5	-30,521	2.109 ns	P>0,05
t2,5 vs t10	-4.117	0,2844 ns	P>0,05
t2,5 vs t40	-199.18	13.760 ***	P<0,001
t5 vs t10	26.404	1.824 ns	P>0,05
t5 vs t40	-168.66	11.652 ***	P<0,001
t10 vs t40	-195.06	13.476 ***	P<0,001

Anexo 4

calo nodular

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is $< 0,0001$, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.302 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0 vs t0,5	24.073	1.932 ns	$P > 0,05$
t0 vs t2,5	33.201	2.176 ns	$P > 0,05$
t0 vs t5	18.686	1.414 ns	$P > 0,05$
t0 vs t10	110,39	8.354 ***	$P < 0,001$
t0 vs t40	30,141	2.419 ns	$P > 0,05$
t0,5 vs t2,5	9.128	0,7327 ns	$P > 0,05$
t0,5 vs t5	-5.387	0,5470 ns	$P > 0,05$
t0,5 vs t10	86.318	8.764 ***	$P < 0,001$
t0,5 vs t40	6.069	0,6889 ns	$P > 0,05$
t2,5 vs t5	-14.515	1.099 ns	$P > 0,05$
t2,5 vs t10	77.189	5.842 **	$P < 0,01$
t2,5 vs t40	-3.060	0,2456 ns	$P > 0,05$
t5 vs t10	91.704	8.500 ***	$P < 0,001$
t5 vs t40	11.455	1.163 ns	$P > 0,05$
t10 vs t40	-80,249	8.148 ***	$P < 0,001$

Anexo 5

calo compacto

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.594 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0 vs t0,12	-13.841	1.904	ns P>0,05
t0 vs t0,25	51.191	5.750	** P<0,01
t0 vs t0,5	16.891	2.324	ns P>0,05
t0 vs t2,5	2.610	0,2932	ns P>0,05
t0 vs t5	20,766	2.333	ns P>0,05
t0 vs t10	113.98	12.803	*** P<0,001
t0 vs t40	34.798	4.514	ns P>0,05
t0,12 vs t0,25	65.033	8.947	*** P<0,001
t0,12 vs t0,5	30,732	5.979	** P<0,01
t0,12 vs t2,5	16.451	2.263	ns P>0,05
t0,12 vs t5	34.607	4.761	* P<0,05
t0,12 vs t10	127.82	17.585	*** P<0,001
t0,12 vs t40	48.639	8.464	*** P<0,001
t0,25 vs t0,5	-34.300	4.719	* P<0,05
t0,25 vs t2,5	-48.581	5.457	* P<0,05
t0,25 vs t5	-30,426	3.418	ns P>0,05
t0,25 vs t10	62.784	7.053	*** P<0,001
t0,25 vs t40	-16.393	2.126	ns P>0,05
t0,5 vs t2,5	-14.281	1.965	ns P>0,05
t0,5 vs t5	3.875	0,5331	ns P>0,05
t0,5 vs t10	97.085	13.357	*** P<0,001
t0,5 vs t40	17.907	3.116	ns P>0,05
t2,5 vs t5	18.156	2.039	ns P>0,05
t2,5 vs t10	111.37	12.510	*** P<0,001
t2,5 vs t40	32.188	4.175	ns P>0,05
t5 vs t10	93.210	10,470	*** P<0,001
t5 vs t40	14.032	1.820	ns P>0,05
t10 vs t40	-79.178	10,270	*** P<0,001

Anexo 6

calo oxidado

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.532 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
t0,12 vs t0,25	26.071	3.949	*	P<0,05
t0,12 vs t0,5	122.43	18.543	***	P<0,001
t0,25 vs t0,5	96.356	14.594	***	P<0,001

Dados Estatísticos dos teores de Proteínas solúveis (mg g^{-1} de massa seca) nos diferentes calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D de obtidos pelos testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer, considerando como significativas diferenças com $p < 0,05$

Anexo 7

calo friavel

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is $< 0,0001$, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.225 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0 vs t0,12	-66.028	8.164 ***	$P < 0,001$
t0 vs t2,5	-42.662	7.460 ***	$P < 0,001$
t0 vs t5	-7.392	1.293 ns	$P > 0,05$
t0 vs t10	-102.28	17.885 ***	$P < 0,001$
t0 vs t40	-158.98	27.800 ***	$P < 0,001$
t0,12 vs t2,5	23.366	2.889 ns	$P > 0,05$
t0,12 vs t5	58.636	7.250 ***	$P < 0,001$
t0,12 vs t10	-36.249	4.482 *	$P < 0,05$
t0,12 vs t40	-92.950	11.493 ***	$P < 0,001$
t2,5 vs t5	35.270	6.168 **	$P < 0,01$
t2,5 vs t10	-59.615	10,425 ***	$P < 0,001$
t2,5 vs t40	-116.32	20,340 ***	$P < 0,001$
t5 vs t10	-94.885	16.592 ***	$P < 0,001$
t5 vs t40	-151.59	26.507 ***	$P < 0,001$
t10 vs t40	-56.700	9.915 ***	$P < 0,001$

Anexo 8

Calo nodular

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.260 then the P value is less than 0,05.

Mean			
Comparison	Difference	q	P value
=====			
t0 vs t0,5	-209.94	20,380 ***	P<0,001
t0 vs t2,5	-4.307	0,3414 ns	P>0,05
t0 vs t5	69.711	6.767 ***	P<0,001
t0 vs t10	51.543	5.004 *	P<0,05
t0 vs t40	83.832	8.138 ***	P<0,001
t0,5 vs t2,5	205.64	19.962 ***	P<0,001
t0,5 vs t5	279.66	38.393 ***	P<0,001
t0,5 vs t10	261.49	35.899 ***	P<0,001
t0,5 vs t40	293.78	40,331 ***	P<0,001
t2,5 vs t5	74.018	7.185 ***	P<0,001
t2,5 vs t10	55.850	5.422 **	P<0,01
t2,5 vs t40	88.139	8.556 ***	P<0,001
t5 vs t10	-18.168	2.494 ns	P>0,05
t5 vs t40	14.121	1.939 ns	P>0,05
t10 vs t40	32.289	4.433 *	P<0,05

Anexo 9

calo compacto

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.570 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0 vs t0,12	-132.74	22.573 ***	P<0,001
t0 vs t0,25	13.576	1.885 ns	P>0,05
t0 vs t0,5	-126.07	21.437 ***	P<0,001
t0 vs t2,5	-62.634	8.696 ***	P<0,001
t0 vs t5	-61.333	8.516 ***	P<0,001
t0 vs t10	-106.64	14.807 ***	P<0,001
t0 vs t40	78.671	13.378 ***	P<0,001
t0,12 vs t0,25	146.32	24.881 ***	P<0,001
t0,12 vs t0,5	6.676	1.605 ns	P>0,05
t0,12 vs t2,5	70,109	11.922 ***	P<0,001
t0,12 vs t5	71.410	12.143 ***	P<0,001
t0,12 vs t10	26.100	4.438 ns	P>0,05
t0,12 vs t40	211.41	50,842 ***	P<0,001
t0,25 vs t0,5	-139.64	23.746 ***	P<0,001
t0,25 vs t2,5	-76.210	10,581 ***	P<0,001
t0,25 vs t5	-74.909	10,401 ***	P<0,001
t0,25 vs t10	-120,22	16.692 ***	P<0,001
t0,25 vs t40	65.095	11.069 ***	P<0,001
t0,5 vs t2,5	63.434	10,787 ***	P<0,001
t0,5 vs t5	64.735	11.008 ***	P<0,001
t0,5 vs t10	19.424	3.303 ns	P>0,05
t0,5 vs t40	204.74	49.236 ***	P<0,001
t2,5 vs t5	1.301	0,1806 ns	P>0,05
t2,5 vs t10	-44.010	6.110 **	P<0,01
t2,5 vs t40	141.30	24.029 ***	P<0,001
t5 vs t10	-45.311	6.291 **	P<0,01
t5 vs t40	140,00	23.807 ***	P<0,001
t10 vs t40	185.31	31.512 ***	P<0,001

Anexo 10

calo oxidado

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.532 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
t0,12 vs t0,25	33.532	6.342 ***	P<0,001
t0,12 vs t0,5	206.81	39.112 ***	P<0,001
t0,25 vs t0,5	173.28	32.770 ***	P<0,001
Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
t0,12 - t0,25	33.532	14.856	52.209
t0,12 - t0,5	206.81	188.14	225.49
t0,25 - t0,5	173.28	154.60	191.96

Dados Estatísticos dos teores de amido (mg g^{-1} de massa seca) nos diferentes calos (friável, nodular, compacto e oxidado) de *S. spectabilis* nos tratamentos com 0,0; 0,12; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D de obtidos pelos testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer, considerando como significativas diferenças com $p < 0,05$

Anexo 11

calo friáveis

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is $< 0,0001$, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.267 then the P value is less than 0,05.

Mean			
Comparison	Difference	q	P value
=====			
t0 vs t0,12	-5.053	2.842	ns $P > 0,05$
t0 vs t2,5	1.053	0,7251	ns $P > 0,05$
t0 vs t5	-0,6566	0,4955	ns $P > 0,05$
t0 vs t10	-31.908	24.080	*** $P < 0,001$
t0 vs t40	-10,699	7.880	*** $P < 0,001$
t0,12 vs t2,5	6.106	3.435	ns $P > 0,05$
t0,12 vs t5	4.397	2.623	ns $P > 0,05$
t0,12 vs t10	-26.854	16.022	*** $P < 0,001$
t0,12 vs t40	-5.646	3.317	ns $P > 0,05$
t2,5 vs t5	-1.709	1.290	ns $P > 0,05$
t2,5 vs t10	-32.960	24.874	*** $P < 0,001$
t2,5 vs t40	-11.751	8.655	*** $P < 0,001$
t5 vs t10	-31.251	26.368	*** $P < 0,001$
t5 vs t40	-10,042	8.220	*** $P < 0,001$
t10 vs t40	21.209	17.360	*** $P < 0,001$

Anexo 12

calo nodular

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.373 then the P value is less than 0,05.

		Mean			
Comparison	Difference	q		P value	
=====					
t0 vs t0,5	4.118	1.925	ns	P>0,05	
t0 vs t2,5	-11.225	4.545	*	P<0,05	
t0 vs t5	2.724	1.274	ns	P>0,05	
t0 vs t10	-23.972	11.208	***	P<0,001	
t0 vs t40	2.874	1.344	ns	P>0,05	
t0,5 vs t2,5	-15.342	7.173	***	P<0,001	
t0,5 vs t5	-1.394	0,7981	ns	P>0,05	
t0,5 vs t10	-28.089	16.085	***	P<0,001	
t0,5 vs t40	-1.244	0,7123	ns	P>0,05	
t2,5 vs t5	13.949	6.522	**	P<0,01	
t2,5 vs t10	-12.747	5.960	**	P<0,01	
t2,5 vs t40	14.098	6.592	**	P<0,01	
t5 vs t10	-26.696	15.287	***	P<0,001	
t5 vs t40	0,1498	0,08580	ns	P>0,05	
t10 vs t40	26.845	15.373	***	P<0,001	

Anexo 13

calo compacto

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0,0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.629 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
=====			
t0 vs t0,12	1.114	3.055	ns P>0,05
t0 vs t0,25	-2.976	7.069	*** P<0,001
t0 vs t0,5	3.005	8.242	*** P<0,001
t0 vs t2,5	-1.960	4.655	* P<0,05
t0 vs t5	0,3713	0,8820	ns P>0,05
t0 vs t10	0,5650	1.342	ns P>0,05
t0 vs t40	0,5561	1.618	ns P>0,05
t0,12 vs t0,25	-4.090	11.218	*** P<0,001
t0,12 vs t0,5	1.891	6.352	** P<0,01
t0,12 vs t2,5	-3.074	8.431	*** P<0,001
t0,12 vs t5	-0,7427	2.037	ns P>0,05
t0,12 vs t10	-0,5490	1.506	ns P>0,05
t0,12 vs t40	-0,5579	2.053	ns P>0,05
t0,25 vs t0,5	5.982	16.405	*** P<0,001
t0,25 vs t2,5	1.016	2.414	ns P>0,05
t0,25 vs t5	3.348	7.951	*** P<0,001
t0,25 vs t10	3.541	8.411	*** P<0,001
t0,25 vs t40	3.532	10,276	*** P<0,001
t0,5 vs t2,5	-4.965	13.617	*** P<0,001
t0,5 vs t5	-2.634	7.224	*** P<0,001
t0,5 vs t10	-2.440	6.692	** P<0,01
t0,5 vs t40	-2.449	9.011	*** P<0,001
t2,5 vs t5	2.331	5.537	* P<0,05
t2,5 vs t10	2.525	5.997	** P<0,01
t2,5 vs t40	2.516	7.319	*** P<0,001
t5 vs t10	0,1937	0,4600	ns P>0,05
t5 vs t40	0,1848	0,5375	ns P>0,05
t10 vs t40	-0,008889	0,02586	ns P>0,05

Anexo 14

calos oxidados

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is $< 0,0001$, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.567 then the P value is less than 0,05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
t0,12 vs t0,25	-0,3298	1.084	ns	$P > 0,05$
t0,12 vs t0,5	2.195	7.210	***	$P < 0,001$
t0,25 vs t0,5	2.524	9.273	***	$P < 0,001$

As figuras a seguir representam os cromatogramas de padrão de espectralina (4mg L^{-1}) e o cromatograma da amostra de calos friáveis do tratamento $2,5\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D também concentrado para 4mg L^{-1} de amostra

