

# INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES E SEGMENTOS NODAIS DE SUCUÚBA<sup>1</sup>

## INDUCTION OF INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SUCUUBA LEAF EXPLANTS AND NODAL SEGMENTS

Rayssa Gomes Vasconcelos<sup>2</sup>, Raquel da Silva Medeiros<sup>3</sup>, Daniel da Silva<sup>4</sup>,  
Kamylla Rosas Vieira Guedes<sup>5</sup> e Paulo de Tarso Barbosa Sampaio<sup>6</sup>

### RESUMO

A embriogênese somática pode ser uma alternativa para a produção de mudas de espécies nativas com importância socioeconômica, como a sucuúba. Neste sentido, este estudo teve como objetivo induzir a embriogênese somática em calos originados de segmentos nodais e foliares em diferentes condições de cultivo. Inicialmente, a formação de calos nos explantes foi induzida em meio de cultura Murashige e Skoog (MS), com ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e Tidiazuron (TDZ) (18,08+9,8 µM e 4,52+6,81 µM). Os calos friáveis obtidos foram transferidos para meio B5-Gamborg (B5) suplementado com carvão ativado e ácido abscísico (ABA), para maturação de estruturas embriogênicas. O potencial de conversão de embriões em plântulas foi avaliado em meio B5 suplementado com AIB (ácido indolbutírico) + BAP (6-benzilaminopurina). O delineamento utilizado nas fases de maturação e germinação foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2x2x4 e 2x2x2, respectivamente: 2 explantes, 2 condições de luminosidade (luz branca e escuro), 4 concentrações de ABA (0, 10, 20 e 30 µM) ou 2 concentrações de AIB + BAP (1+2,5 µM e 1+5 µM). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a p<0,05. Houve uma interação dupla entre o tipo de explante e a luminosidade, e ausência de diferenças significativas para o ABA. O protocolo de indução de calos foi eficiente, enquanto os protocolos de maturação e germinação não viabilizaram a obtenção de plântulas. Desta forma, novos estudos devem ser realizados a fim de minimizar a contaminação e oxidação fenólica, e consequentemente, intensificar a expressão da embriogênese somática.

**Palavras-chave:** Apocynaceae, Cultivo *in vitro*, Embriões somáticos.

### ABSTRACT

*Somatic embryogenesis can be an alternative for seedling production of native species with socioeconomic importance, such as sucuuba. In this sense, this study aimed to induce somatic embryogenesis in callus originated from nodal and leaf segments under different culture conditions. Initially, callus formation on explants was induced in Murashige and Skoog (MS) culture medium with dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)*

1 Dissertação de Mestrado.

2 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. E-mail: rayssa.gomesvasc@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-4656>

3 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. E-mail: rsmede@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7411-2879>

4 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. E-mail: danieldasilva23@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9217-4213>

5 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. E-mail: kamyllarosas19@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8476-4487>

6 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. E-mail: sampaio@inpa.gov.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0254-7651>

and Tidiazuron (TDZ) (18.08+9.8  $\mu\text{M}$  and 4.52+6.81  $\mu\text{M}$ ). The friable calli obtained were transferred to B5-Gamborg (B5) medium supplemented with activated charcoal and abscisic acid (ABA) for maturation of embryogenic structures. The potential for conversion of embryos into seedlings was evaluated on B5 medium supplemented with indolbutyric acid (IBA) +BAP (6-benzylaminopurine). The design used in the maturation and germination phases was entirely randomized, with 2x2x4 and 2x2x2 factorial arrangement, respectively: 2 explants, 2 lighting conditions (white light and dark), 4 concentrations of ABA (0, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ ) or 2 concentrations of AIB + BAP (1+2.5  $\mu\text{M}$  and 1+5  $\mu\text{M}$ ). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at  $p < 0.05$ . There was a two-way interaction between explant type and luminosity, and absence of significant differences for ABA. The callus induction protocol was efficient, while the maturation and germination protocols did not make it possible to obtain seedlings. Thus, further studies should be conducted to minimize phenolic contamination and oxidation, and consequently, intensify the expression of somatic embryogenesis.

**Keywords:** Apocynaceae, In vitro culture, Somatic embryos.

## INTRODUÇÃO

Nativa da região amazônica, *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson é uma espécie arbórea latescente, comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de afecções em geral (RIOS; PASTORE JÚNIOR, 2011). Estudos recentes conduzidos com diferentes espécies do gênero confirmaram a presença de substâncias com propriedades anti-inflamatória (ALMEIDA *et al.*, 2019), antimicrobiana e analgésica (SAMROT *et al.*, 2022), contribuindo para a intensificação do extrativismo do látex.

Entretanto, o extrativismo quando praticado indiscriminadamente pode comprometer a dinâmica das populações naturais (LINHARES; PINHEIRO, 2013; SILVA *et al.*, 2018). Faz-se necessária então a adoção de medidas que viabilizem tanto a conservação da espécie quanto o uso economicamente viável de recursos. Entre as alternativas está o estabelecimento de plantios comerciais. Contudo, a implementação desses povoamentos requer a produção de mudas em larga escala, que muitas vezes é dificultada pela indisponibilidade de propágulos sexuais (XAVIER *et al.*, 2009). Por outro lado, a propagação assexuada ou vegetativa, além de possibilitar a produção massiva de mudas, também permite a clonagem de genótipos superiores com características de interesse (ABIYU *et al.*, 2016).

Entre as diversas técnicas, a embriogênese somática se destaca como uma importante ferramenta para a propagação de plantas (MORAIS *et al.*, 2012). Têm aplicabilidades relacionadas à multiplicação de plantas elites oriundas de programas de melhoramento, plantas transgênicas e sementes sintéticas (MAHESHWARI; GARG, 2023; NGUYEN *et al.*, 2023). E na última década, resultados satisfatórios acerca da regeneração de plantas via embriogênese somática já foram reportados para espécies lenhosas como *Swietenia macrophylla* (ARIAS *et al.*, 2019), podendo ser uma alternativa viável para a multiplicação de outras espécies economicamente importantes, como *H. sucuuba*.

Mas apesar de ser uma técnica promissora, ainda persistem incertezas quanto ao controle e manipulação do processo embriogenético que precisam ser investigadas. Neste sentido, o presente

estudo teve como objetivo induzir a embriogênese somática em *H. sucuuba*, a fim de avaliar o potencial embriogenético de segmentos nodais e foliares, submetidos a diferentes condições de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (3°05'32,6" S, 59°59'34,1" W). Como fonte de material vegetal foram utilizadas plântulas estabelecidas *in vitro*, obtidas a partir da germinação das sementes de *H. sucuuba* em condições assépticas (SÁENZ-RAMÍREZ, 2019). Estas plântulas foram seccionadas para a obtenção de dois tipos de explantes: segmentos nodais ( $\approx 1$  cm), inoculados em posição vertical, e segmentos foliares ( $\approx 1$  cm<sup>2</sup>).

Na câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio MS (M5519, Sigma®) ou B5 (G5768, Sigma®), suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e os reguladores de crescimento específicos de cada fase. No caso do meio B5, foram ainda adicionados: piridoxina (1 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (10 mg L<sup>-1</sup>) e ácido nicotínico (1 mg L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado em 5,89 e os meios foram esterilizados em autoclave com pressão ajustada de 1 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2 °C, no escuro ou presença de luz (com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 31±1 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), fornecida por LEDs brancas T8-TUBE LAMP.

Para a fase de indução, os segmentos nodais foram cultivados em meio MS, suplementado com 18,08 de 2,4-D e 9,80 μM de TDZ, na presença de luz. E os segmentos foliares, em meio MS com 4,52 de 2,4-D e 6,81 μM de +TDZ, no escuro (SÁENZ-RAMÍREZ, 2019). Cada tipo de explante correspondeu a um experimento independente, composto por 30 repetições e 6 explantes por parcela. Um subcultivo foi realizado após 15 dias de cultivo, e aos 30 dias foram avaliadas a percentagem de sobrevivência dos explantes, formação e natureza dos calos (cor e textura). Os resultados foram avaliados por meio de estatística descritiva a partir da observação de frequências simples e absolutas (ANDRADE; OGLIARI, 2005).

Na fase de maturação, calos friáveis obtidos na fase anterior foram transferidos para o meio B5, acrescido de ABA e 2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2x2x4: 2 explantes (calos de segmentos nodais e foliares), 2 condições de luminosidade (luz branca e escuro) e 4 concentrações de ABA (0, 10, 20 e 30 μM). O experimento foi composto por 2 repetições com 3 explantes por parcela. Um subcultivo foi realizado após 15 dias e aos 30 dias os calos foram avaliados quanto a percentagem de sobrevivência, contaminação, oxidação e formação de massas pró-embriogênicas.

Na fase de germinação, as culturas embriogênicas resultantes da fase anterior foram transferidas para a fase de germinação em meio B5, acrescidos de uma combinação de AIB+BAP, além de

2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2x2x2: 2 explantes (calos de segmentos nodais e foliares), 2 condições de luminosidade (luz branca e escuro) e 2 concentrações de AIB + BAP (1 + 2,5 µM e 1 + 5 µM). O experimento foi composto por 3 repetições com 2 explantes por parcela. Após 30 dias foram avaliadas a percentagem de sobrevivência, contaminação, oxidação e embriões convertidos em plantas.

Na análise estatística, a normalidade dos dados e a homogeneidade da variância foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene ( $p > 0,05$ ) (ANDRADE; OGLIARI, 2005). A seguir, os resultados obtidos na fase de maturação e germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software R Core Team (2016) versão 3.6.0, e tiveram suas médias comparadas entre si, pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de calos em segmentos nodais e foliares de *H. succuba* teve início entre o 10° e 13° dia após inoculação, quando foi verificado o intumescimento dos tecidos seguido do processo de desdiferenciação. Taxas de sobrevivência dos explantes foram superiores a 90%, independentemente da condição de luminosidade (Tabela 1).

**Tabela 1** - Comportamento dos explantes de *H. succuba* após 30 dias em meio MS.

Explante/ Luminosidade	Sobrevivência	Formação de calos (%)	Calos Friáveis
Segmentos nodais LED's brancas	100	100	78,33
Segmentos foliares Escuro	93,78	100	74,56

Fonte: Construção dos autores.

O meio MS suplementado com auxina (2,4-D) e citocinina (TDZ) induziu a máxima formação de calos, corroborando os resultados anteriormente obtidos por Sáenz-Ramírez (2019). Outros estudos também demonstram que a interação de auxinas e citocininas favorece a calogênese em diferentes espécies florestais e medicinais. Santos *et al.* (2013) utilizaram uma combinação de 2,4-D (9,04 µM) e TDZ (14,53 µM) para indução de calos em explantes de *Bertholletia excelsa* e obtiveram um percentual de 75%. Similarmente, foi constatado que o uso combinado de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, estimulou significativamente a indução de calos em segmentos nodais de *Senna alata* (LARA *et al.*, 2022).

Resultados distintos foram relatados por Reis *et al.* (2007) para a espécie *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*, onde os maiores percentuais de calogênese foram obtidos nos tratamentos sem adição de reguladores de crescimento. Ou seja, as respostas obtidas *in vitro* são altamente dependentes

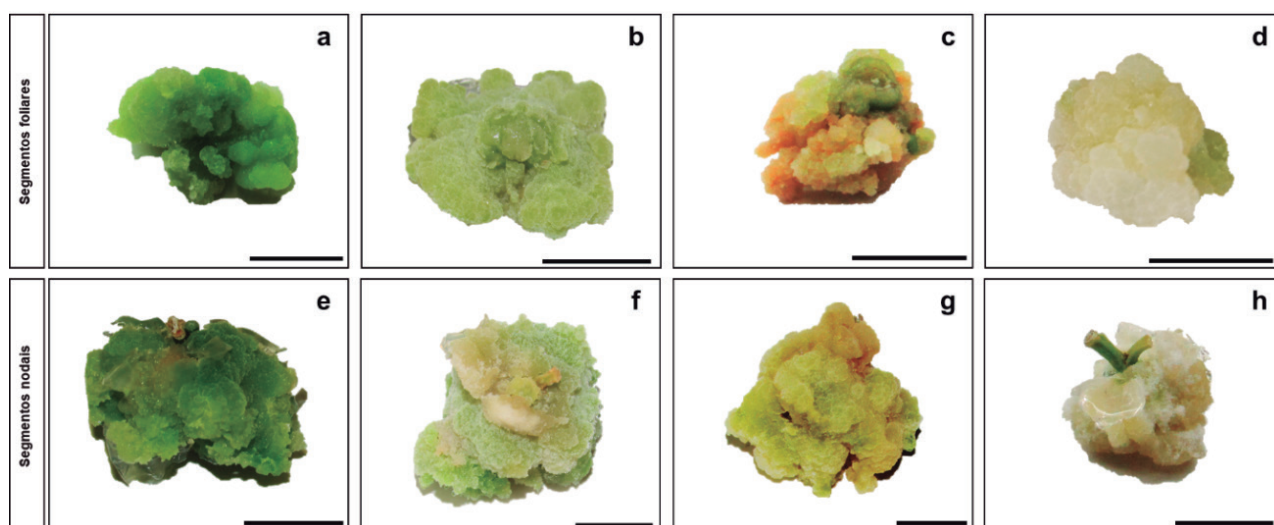
do genótipo em estudo e do balanço hormonal entre auxinas e citocininas (HARTMANN *et al.*, 2011). Quando está próximo do ideal pode estimular a desdiferenciação celular. Ou, quando há um desbalançamento, exerce um efeito antagônico inibindo as respostas desejadas (SOUZA *et al.*, 2023).

No presente estudo, os resultados indicam que possivelmente um balanço hormonal próximo ao ideal para cada tipo de explante foi alcançado. Para os segmentos nodais foi necessário utilizar uma concentração da auxina 2,4-D (18,08  $\mu\text{M}$ ) aproximadamente duas vezes maior do que a da citocinina TDZ (9,08  $\mu\text{M}$ ). Enquanto para os segmentos foliares ocorreu o inverso, sendo o 2,4-D (4,52  $\mu\text{M}$ ) adicionado ao meio de cultura em menor quantidade do que o TDZ (6,81  $\mu\text{M}$ ).

Tal comportamento pode estar relacionado com os locais em que a auxina endógena é sintetizada. Explantes de folhas jovens e de meristemas apicais por serem os principais sítios de síntese desse hormônio (TAIZ *et al.*, 2017), teoricamente demandariam uma menor concentração de auxina exógena para atingir o balanço hormonal. Em contrapartida, no momento da inoculação dos segmentos nodais em meio de cultura esses sítios são removidos. Isso resultaria em uma maior demanda de auxina exógena para balancear o conteúdo interno, como observado em explantes de *H. succuba*.

Aos 30 dias, os calos também foram avaliados quanto à coloração e textura. Nos calos oriundos de segmentos foliares cultivados no escuro, predominaram as tonalidades amarelas e esbranquiçadas (Figura 1). Enquanto nos segmentos nodais, expostos à luz branca, os calos apresentaram-se em sua maioria nas cores verde e esbranquiçada. Quanto à textura, os calos foram classificados em friáveis, semi-compactos e compactos. Os segmentos nodais promoveram a maior taxa média de indução de calos friáveis, caracterizados pela fácil desfragmentação no momento da manipulação. Já para os segmentos foliares o percentual obtido foi de 74,56% (Tabela 1).

**Figura 1** - Coloração de calos obtidos a partir de segmentos foliares e segmentos nodais: (a), (e) verde-escura; (b), (f) verde-clara; (c), (g) amarelada; (d), (h) translúcida-esbranquiçada (Barra = 1 cm)



Os constituintes do meio de cultura podem alterar as características (cor e textura) dos calos. Existe ainda as alterações relacionadas às condições ambientais as quais os explantes serão submetidos, tais como a luminosidade. Werner *et al.* (2009) ao induzirem a calogênese em *Caesalpinia echinata* reportaram a predominância de porções esverdeadas nos calos mantidos sob luz. Os autores atribuíram este fato à síntese de pigmentos de clorofila, desencadeada pela exposição dos calos à luz constante, corroborando os resultados observados para os calos de segmentos nodais de *H. succuba*.

Na fase de maturação, houve interação entre a luminosidade e o tipo de explante que originou os calos. Contudo, médias estatisticamente diferentes foram identificadas somente para as variáveis sobrevivência e oxidação (Tabela 2). A manutenção da cultura sob luz de LED's brancas resultou na maior percentagem de sobrevivência para os calos de segmentos nodais. Enquanto o escuro favoreceu a sobrevivência dos calos originados a partir de segmentos foliares. Em termos de percentual médio, houve um incremento de 28% em relação aos calos cultivados na presença de luz (Tabela 3).

**Tabela 2** - Resumo da Análise de Variância para as variáveis sobrevivência (SOB), oxidação (OXID), contaminação (CONT) e presença de massas pró-embriogênicas (MPE) dos calos originados a partir de segmentos nodais e foliares de *H. succuba*.

Causas de variação	GL	QUADRADO MÉDIO			
		SOB (%)	OXID (%)	CONT (%)	MPE (%)**
Explante (E)	1	1134,62 <sup>ns</sup>	1874,88 <sup>ns</sup>	370,35 <sup>ns</sup>	10,85 <sup>ns</sup>
Luminosidade (L)	1	1875,37*	5208,54*	833,25 <sup>ns</sup>	6,28 <sup>ns</sup>
Ácido abscísico (ABA)	3	625,18 <sup>ns</sup>	1921,52 <sup>ns</sup>	462,95 <sup>ns</sup>	13,41 <sup>ns</sup>
ExL	1	1875,38*	8357,98*	1481,52 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>
ExABA	3	1181,01 <sup>ns</sup>	5255,05 <sup>ns</sup>	2778,11 <sup>ns</sup>	19,35 <sup>ns</sup>
LxABA	3	439,81 <sup>ns</sup>	2291,79 <sup>ns</sup>	2315,32 <sup>ns</sup>	58,12 <sup>ns</sup>
ExLxABA	3	439,81 <sup>ns</sup>	2106,39 <sup>ns</sup>	3518,65 <sup>ns</sup>	20,21 <sup>ns</sup>
Resíduo	32	11854,82	26668,00	25926,07 <sup>ns</sup>	307,64 <sup>ns</sup>
CV (%)		24,58	25,03	20,03	72,58

<sup>ns</sup> não significativo; \* significativo a  $p < 0,05$ ; \*\* dados transformados para  $\arcsen(x/100)^{1/2}$

Fonte: Construção dos autores.

Nesta fase foram verificadas altas taxas de oxidação, principalmente para os calos de segmentos foliares. Na presença de luz superou 80%, enquanto no escuro foi 2,2 vezes menor (Tabela 3). Adicionalmente à oxidação também foi registrada a presença de contaminação bacteriana em ambos os explantes. Para *Eremanthus incanus* (MIRANDA *et al.*, 2019) e *Dipteryx alata* (REZENDE *et al.*, 2019) também foram registradas perdas expressivas em decorrência da contaminação e oxidação fenólica.

**Tabela 3** - Dados do desdobramento médio da sobrevivência e oxidação dos calos originados a partir de segmentos nodais e foliares de *H. succuba*.

Origem dos calos	SOBREVIVÊNCIA (%)	
	LED's brancas	Escuro
Segmento nodal	58,33 aA	54,13 aA
Segmento foliar	36,1 bB	61,11 aA
OXIDAÇÃO (%)		
Segmento nodal	47,22 aA	52,78 bA
Segmento foliar	86,11 bB	38,89 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de  $p < 0,05$

Fonte: Construção dos autores.

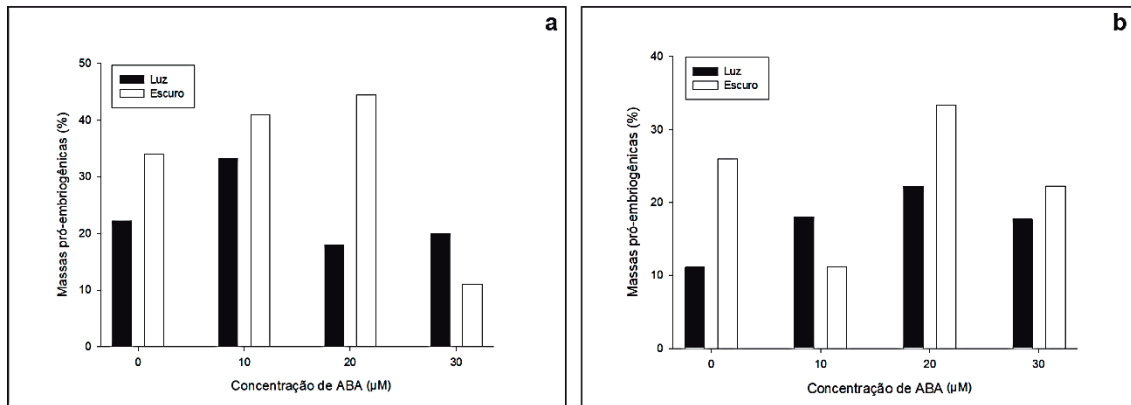
Como os explantes de *H. succuba* foram obtidos a partir de plantas cultivadas *in vitro*, possivelmente tais contaminações foram provenientes da manipulação. A transferência entre frascos durante os subcultivos pode tornar o material mais susceptível a ação de microrganismos contaminantes. Contudo, não se descarta a possibilidade da existência de infecções latentes, já que esse tipo de contaminação normalmente não apresenta crescimento perceptível no meio, nem sintomas nos tecidos nos primeiros subcultivos (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Já a oxidação fenólica é um processo natural nos tecidos vegetais e o escurecimento dos explantes é atribuído à polifenoloxidase (MIRANDA *et al.*, 2019). Algumas medidas para contornar esse problema incluem a suplementação do meio com substâncias antioxidantes ou adsorventes, como o carvão ativado (MORAIS *et al.*, 2012; LARA *et al.*, 2022). Contudo, o uso de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado não foi eficiente no controle da oxidação dos calos de *H. succuba*. Em contrapartida, para variedades de *Rubus idaeus* o uso de 2 e 4 g L<sup>-1</sup>, resultou nos menores índices oxidativos (FAGUNDES *et al.*, 2017).

É válido considerar que fatores abióticos como a luminosidade, também podem impactar na resposta dos explantes a oxidação (HARTMANN *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017). Ao que tudo indica a exposição dos calos a uma nova condição de luminosidade na fase de maturação, gerou um estresse ambiental que intensificou o processo oxidativo. Os piores índices foram registrados no escuro para os calos de segmentos nodais, e na luz, para os calos de segmentos foliares.

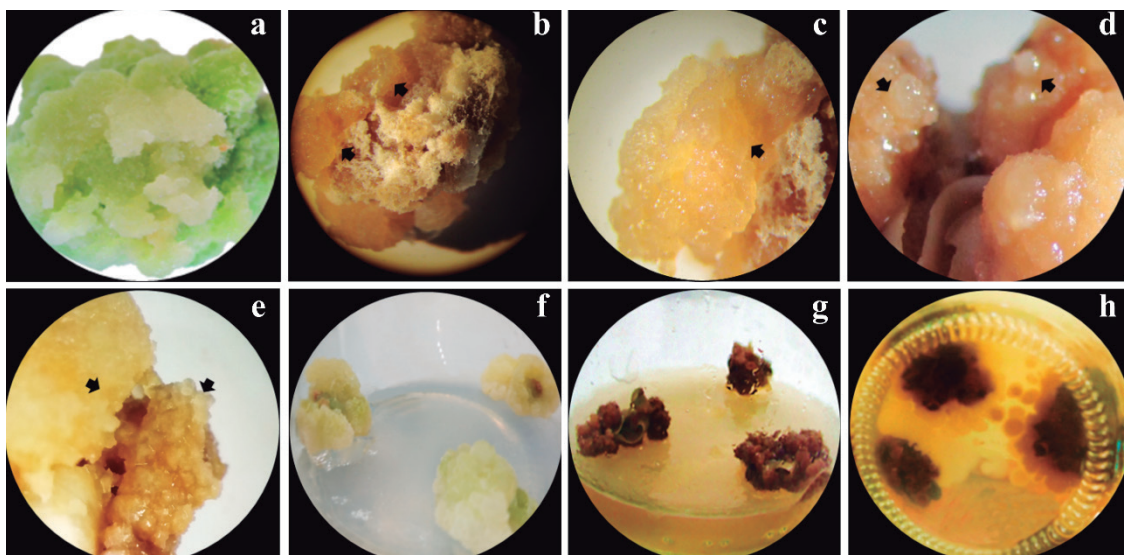
Quanto a formação de massas pró-embriogênicas (MPE's), não foi detectada significância estatística para as diferentes concentrações de ABA. Após 30 dias em meio de maturação, as MPE's foram verificadas em 28,01% dos calos originados a partir de segmentos nodais, e em 20,21% dos calos de segmentos foliares. Houve a formação de MPE's em todas as condições de luminosidade testadas (Figura 2), embora o escuro pareça ter favorecido a proliferação dessas estruturas.

**Figura 2** - Percentuais de formação de massas pró-embriogênicas (MPE's) em calos originados a partir de (a) segmentos nodais e (b) e segmentos foliares



Os calos classificados como não-embriogênicos, nos quais não foram registradas a presença de MPE's e embriões somáticos, apresentaram aspecto compacto e coloração esbranquiçada (Figura 3a). Enquanto os calos predominantemente friáveis, originaram MPE's com coloração amarela-translúcida (Figura 3b-c). Foi possível registrar ainda estruturas semelhantes a embriões na fase globular em ambos os explantes, no entanto, em quantidades inferiores a 25% (Figura 3d-e).

**Figura 3** - Aspecto visual dos calos de *H. sucuuba*: (a) calos não embriogênicos; (b), (c) massas pró-embriogênicas sob a superfície dos calos; (d), (e) estruturas similares a embriões somáticos na fase globular; (f) calos sem indícios de oxidação; (g) oxidação fenólica e escurecimento do meio de cultivo; (h) contaminações bacterianas.



De modo geral, o fornecimento exógeno de ABA é um estímulo importante à maturação (MAHESHWARI; GARG, 2023). Contudo, os efeitos podem ser variáveis em função do genótipo e das condições da cultura embriogênica. No caso de *Elaeis guineenses*, a adição do polietilenoglicol e ABA nas concentrações 3, 6, 12 e 24 µM, resultaram em um baixo número de embriões somáticos (QUEIROZ, 2017). De forma análoga, os resultados obtidos para *H. sucuuba* sugerem que as

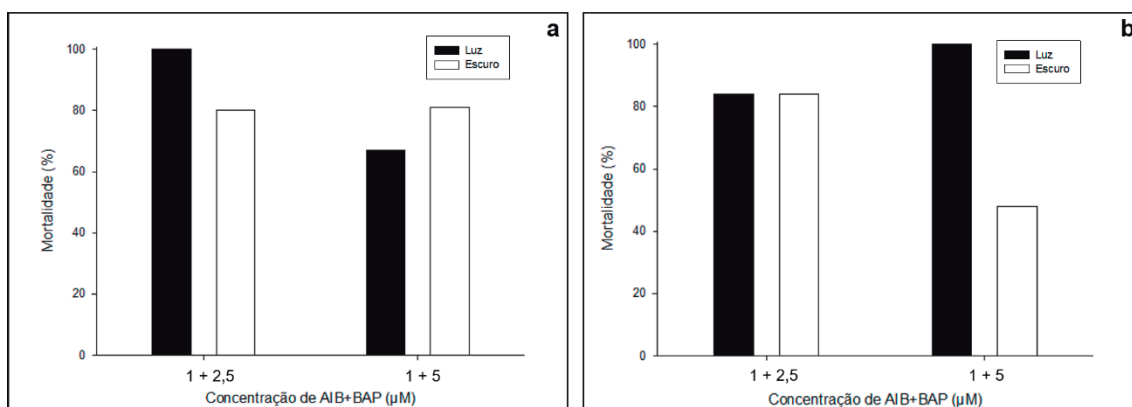


concentrações testadas, ou o tempo de exposição ao ABA não foram eficazes para a obtenção de um número expressivo de embriões somáticos.

Além disso, dependendo da espécie faz-se necessária ainda uma fase intermediária de cultivo em um meio sem regulador de crescimento, antes da exposição aos agentes de maturação (HARTMANN *et al.*, 2011). Como os calos de *H. succuba* foram transferidos diretamente do meio de indução para o de maturação, os efeitos residuais do 2,4-D e TDZ, podem ter retardado o processo de expressão da embriogênese somática.

Na fase de germinação, a percentagem média de sobrevivência dos calos foi inferior a 19,50%. Foi observado 100% de mortalidade em alguns tratamentos independentemente da condição de luminosidade e tipo de explante testados (Figura 4). O declínio da cultura começou a ser observada a partir da primeira semana de subcultivo, associada à contaminação bacteriana e oxidação (Figura 3). Quanto às estruturas similares a embriões somáticos visualizadas na fase anterior, não foram registrados avanços para outros estádios ontogenéticos (codiforme, torpedo e cotiledonar). Além disso, não houve indícios de germinação em meio B5 suplementado com AIB+BAP, após 30 dias.

**Figura 4** - Percentuais de mortalidade registrados na fase de germinação para calos originados a partir de (a) segmentos foliares e (b) e segmentos nodais



Como não houve indícios de germinação de embriões somáticos de *H. succuba*, as estruturas identificadas na fase anterior provavelmente ainda estavam imaturas, anormais, ou as concentrações de AIB e BAP não foram adequadas para promover a conversão de embriões em plântulas. Similarmente, Werner *et al.* (2009) também identificaram estruturas semelhantes a embriões somáticos, mas as combinações de 2,4-D e TDZ testadas não foram eficazes. Nesse modo, persiste a necessidade de maiores investigações a fim de intensificar a expressão da embriogênese somática em *H. succuba*.

## CONCLUSÃO

O meio MS suplementado com 2,4-D e TDZ promove a sobrevivência e formação de calos friáveis em explantes de *H. succuba*.

O uso do ABA não foi um fator limitante à formação de massas pró-embriogênicas na fase de maturação, sendo os calos obtidos a partir de segmentos nodais os mais eficientes na formação dessas estruturas.

Na fase de germinação foi verificado baixo percentual de estruturas similares a embriões somáticos, e as concentrações de AIB e BAP testadas, não favoreceram à conversão de embriões em plântulas. Desta forma, recomendamos novos estudos a fim de aprofundar a embriogênese somática desta importante espécie medicinal amazônica.

## REFERÊNCIAS

ABIYU, A.; DEJENE, T.; ESHETE, A.; SISAY, K. Vegetative propagation of *Boswellia papyrifera*: Time of collection and propagule size affect survival and establishment. **Journal of Arid Environments**, v. 133, p. 122-124, 2016. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2016.06.006.

ALMEIDA, S. C. X. DE. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a triterpene-rich fraction from *Himatanthus drasticus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 5, p. 1-12, 2019. DOI: 10.1590/1414-431X20197798.

ANDRADE, D. F. DE; OGLIARI, P. J. **Estatística para as ciências agrárias e biológicas: com noções de experimentação**. 1. ed. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. 358 p.

ARIAS, A. G. *et al.* Morphological and biochemical changes during somatic embryogenesis in mahogany, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 67, n. 3, p. 406-418, 2019. DOI: 10.15517/RBT.V67I3.34172.

FAGUNDES, C. DE M.; MOREIRA, R. M.; RAMM, A.; SCHUCH, M. W.; TOMAZ, Z. F. P. Carvão ativado no estabelecimento in vitro de cultivares de framboeseira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 4, p. 406-413, 2017. DOI: 10.5965/223811711642017406.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E., DAVES JUNIOR, F.T., & GENEVE, R. L. **Plant propagation: Principles and practices**. 8 ed., Boston: Prentice-Hall, 2011. 927 p.

LARA, E. Y. C.; IMAKAWA, A. M.; SILVA, D. DA.; SAMPAIO, P. T. B. *In vitro* callus induction from different explants of *Senna alata* (L.) Robx. (FABACEAE). **Advances in Forestry Science**, v. 9, n. 1, p. 1653-1660, 2022. DOI: 10.34062/afs.v9i1.12928.

LINHARES, J. F. P.; PINHEIRO, C. U. B. Caracterização do sistema de extração de látex de janaúba (*Himatanthus* Willd. ex Schult. - Apocynaceae), no Município de Alcântara, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 23-31, 2013. DOI: 10.5123/S2176-62232013000100004.

MAHESHWARI, S.; GARG, R. Synthetic Seed Technology, Application and Future Trends. **EPH - International Journal of Agriculture and Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2023. DOI: 10.53555/eijaer.v9i1.67.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M. Estabelecimento in vitro de *Eremanthus incanus*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, p. 1-7, 2019. DOI: 10.4336/2019.pfb.39e201701525.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012. DOI: 10.1590/S1516-05722012000100016.

NGUYEN, V. A. *et al.* A practical framework for the cryopreservation of palm species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, p. 1-21, 2023. DOI: 0.1007/s11627-023-10330-y.

QUEIROZ, V. DE. **Regeneração, maturação e germinação in vitro de embriões somáticos em palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de Mestrado, 2017. 33 p.

R Core Team. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 11 mar. 2023.

REIS, I. N. R. DE S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos in vitro de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 498-500, 2007.

REZENDE, R. K.; SCOTON, A. M. N.; JESUS, M. V.; PEREIRA, Z. V.; PINTO, F. Callus induction in baru (*Dipteryx alata* Vog.) explants. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 2, p. 538-543, 2019. DOI: 0.15835/nbha47111366.

RIOS, M. N. DA S.; PASTORE JR, F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. 3140 p.

SÁENZ-RAMÍREZ, L. H. S. **Propagação in vitro, viabilidade das sementes e análise fitoquímica dos extratos de calos de *Himatanthus sucuuba* Wood**. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, Dissertação de Mestrado, 2019. 88 p.

SAMROT, A. V. *et al.* Plant Latex: Phytochemistry, Medicinal Properties and Application - a Review. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 13, n. 7, p. 5351-5375, 2022. DOI: 10.47750/pnr.2022.13.S07.658.

SANTOS, M. R. A. DOS; FERREIRA, M. DAS G. R.; CARVALHO, S. M. DA S. Callus induction in *Bertholletia excelsa* immature seeds. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 4, p. 283-289, 2013.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2012. 446 p.

SILVA, J. B. DA; SILVA, L. B. DA; ALBUQUERQUE, U. P.; CASTRO, C. C. Bark and latex harvesting short-term impact on native tree species reproduction. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 12, p. 744, 2018. DOI: 10.1007/s10661-018-7081-9.

SOUZA, M. J. M. DE F. *et al.* In vitro micropropagation of *Bromelia balansae* Mez.: effects of light intensity and growth regulators on plant development. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 3, p. 1-26, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i3.40518.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

WERNER, E. T; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. DE A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000600001.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, 2009. 279 p.