



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

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



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

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025

INDUÇÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CALOS DE *Physalis ixocarpa* Brot

Ianki Witkoski¹; Jose Raniere Ferreira de Santana²; Rosembrando S. L. Carvalho Filho³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, UEFS, e-mail: iankiwitk@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, e-mail: ranier@uefs.br
3. Participante da pesquisa, Doutor em Recursos Genéticos Vegetais, Programa de Pós-Graduação da UEFS, e-mail: egronomocarvalho@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: embriogênese somática; explante vegetal; cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

Solanaceae é uma família de plantas que conta com um grupo vasto de espécies com potencial alimentício, dentre elas a *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem, também conhecida como Tomatillo, uma cultura vegetal estudada num centro de diversidade no México (Delgado-Alvarado *et al.*, 2018). Esta espécie também possui potencial medicinal como agente hipoglicemiante, antioxidante (Romero-Guerrero *et al.*, 2021), antibacteriano e antifúngico (Khan, Bakht & Shafi, 2016).

Para visar a obtenção deste material vegetal em larga escala, em tempo reduzido, com uniforme genética e qualidade fitossanitária, faz-se necessário a utilização de técnicas biotecnológicas, neste caso, a micropropagação pode ser uma alternativa (Silva *et al.*, 2020).

A embriogênese somática destaca-se entre as técnicas de micropropagação por possibilitar a produção em larga escala de embriões somáticos e a conservação de genótipos superiores por meio da propagação clonal (Carvalho *et al.*, 2013).

Na obtenção dos processos morfogênicos *in vitro*, são utilizados reguladores de crescimento vegetal, sendo considerados os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento da resposta morfogênica induzida *in vitro* (Gaj *et al.*, 2006). A auxina é considerada o principal regulador com principais efeitos fisiológicos no crescimento celular vegetal e o enraizamento (Mercier, 2008). A auxina, em presença contínua no meio de cultura, induz a síntese das proteínas necessárias para iniciar o desenvolvimento do embrião, desde o estágio somático até o estágio globular (Carvalho *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2020).

Nesse contexto objetiva-se estudar o efeito da auxina 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) na indução de calos em *Physalis ixocarpa* e caracterizar seu potencial embriogênico por meio de análises histológicas.

METODOLOGIA

Sementes de *Physalis ixocarpa* foram germinadas e mantidas *in vitro*. Plântulas com 21 dias após germinação foram usadas como fonte de explantes: cotilédones ($\pm 0,4$ cm², com incisões longitudinais), segmentos foliares e segmentos internodais. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 × 150 mm) contendo 10 mL de meio Msmurashige; Skoog (1962), suplementado com 87,64 mM de sacarose e solidificado com 7 g·L⁻¹ de ágar; o pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Testaram-se três concentrações de 2,4-D: 0,0; 10,0 e 50,0 μM , totalizando nove tratamentos (T1–T9: combinações explante $\times$ concentração). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 tipos de explantes $\times$ 3 concentrações), com cinco repetições por tratamento; cada repetição correspondeu a um tubo contendo cinco explantes (total = 9 tratamentos $\times$ 5 repetições $\times$ 5 explantes = 225 explantes). As culturas foram mantidas em câmara B.O.D. a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, na escuridão, e avaliadas aos 56 dias para: porcentagem de explantes com formação de calo (%EFC), porcentagem de calos friáveis (%CFB) e porcentagem de calos com formações globulares (%CFG).

Para a análise histológica, calos selecionados foram fixados em solução de formaldeído 4% (v/v), desidratados em séries crescentes de etanol e infiltrados/incorporados em HistoResin® conforme Silveira *et al.* (2013). Foram confeccionados três blocos por tratamento; cada bloco foi seccionado em micrótomo a 10 μm e montado em cinco lâminas com aproximadamente oito cortes por lâmina; as seções foram coradas com azul de toluidina 1% (10 s) (O'brien *et al.*, 1964) e analisadas em microscópio digital Leica ICC50 W.

Os dados percentuais foram transformados por arco-seno e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância revelou um efeito significativo do regulador 2,4-D para a porcentagem de explantes que formaram calos (%EFC), percentual de calos friáveis (%CFB) e porcentagem de calos com formações globulares (%CFG). Em relação à friabilidade dos calos, a concentração de 2,4-D e o tipo de explante foram fatores determinantes (Tabela 1). Os explantes de folha demonstraram a melhor resposta, alcançando 100% de calos friáveis nas concentrações de 10,0 e 50,0 μM . Para os segmentos internodais, a concentração de 10,0 μM foi mais eficiente do que 50,0 μM , enquanto para os cotilédones, a concentração de 50,0 μM resultou em uma friabilidade significativamente maior do que 10,0 μM .

As concentrações de 10,0 e 50,0 μM do 2,4-D foram as mais eficazes para a formação de calos e formações globulares, resultando em 100% de resposta para ambos os parâmetros, sem diferença estatística entre elas (Tabela 2 e 3). A ausência do regulador (0,0 μM) não resultou na formação de calos.

Tabela 1: Médias para porcentagem de calos que apresentaram friabilidade (%CFB) a partir de explantes de *Physalis ixocarpa* Brot. submetidos a diferentes concentrações de 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) aos 56 dias de cultivo. Feira de Santana, BA. 2024.

2,4-D μM			
Explantes	0,0	10,0	50,0
C	0,0cB	88,00bB	100,00aA
F	0,0bB	100,00aA	100,00aA
SIN	0,0cB	96,00aAB	40,00bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de 2,4-D, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2: Médias para porcentagem de calos que apresentaram formação globular (%CFG) submetidos a diferentes concentrações de 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) aos 56 dias de cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa* Brot. Feira de Santana, BA. 2024.

2,4-D μM

	0,0	10,0	50,0
%CFC	0,0b	100,00a	100,00a

Médias seguidas pela mesma letra em relação a cada concentração de 2,4-D, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3: Médias para porcentagem de formação de calos (%CFC) submetidos a diferentes concentrações de 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) aos 56 dias de cultivo de cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa* Brot. Feira de Santana, BA. 2024.

	2,4-D μM		
	0,0	10,0	50,0
%CFC	0,0b	100,00a	100,00a

Médias seguidas pela mesma letra em relação a cada concentração de 2,4-D, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A observação de que o tipo de explante e a concentração do regulador de crescimento são importantes para a indução de calos em *Physalis ixocarpa* pode ser encontrada em outros estudos. Alvarado *et al.* (2021) também verificaram variações significativas na morfogênese *in vitro* de *P. ixocarpa* em função do explante e da combinação hormonal. O 2,4-D como indutor de calogênese também foi relatado em *Physalis angulata* (Dwitara *et al.*, 2023). No entanto, enquanto em *P. angulata* foram observados calos compactos, neste estudo com *P. ixocarpa*, notou-se a presença de calos friáveis e estruturas globulares, indicando particularidades morfológicas entre espécies próximas da mesma família.

A análise histológica confirmou que os calos com estruturas globulares, conforme visualizado na figura 01, apresentavam células com características associadas ao potencial embriogênico, como células isodiamétricas com núcleo evidente, citoplasma denso e divisões celulares simétricas. Por outro lado, a região periférica dessas estruturas continha células sem núcleo e com grandes vacúolos, um aspecto comum de tecidos calogênicos indiferenciados. Esse padrão celular é semelhante ao descrito para calos embriogênicos em outras espécies, como *Phoenix dactylifera* L. (Zein El Din *et al.*, 2021). A presença de formações globulares em calos cultivados com 2,4-D reforça o potencial regenerativo de *P. ixocarpa*, uma vez que essas estruturas são reconhecidas como indicativas de competência embriogênica.

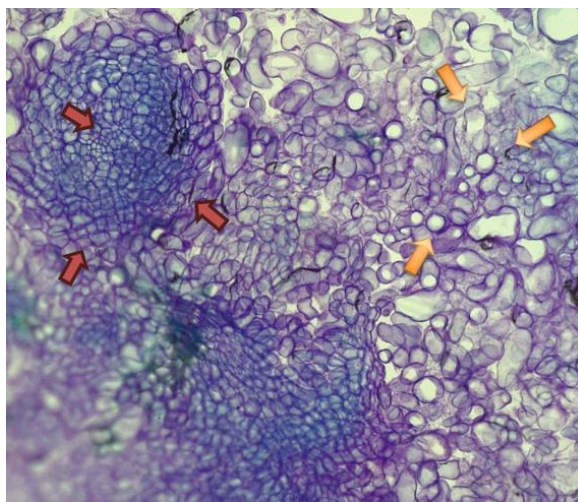


Figura 01: Aspecto histológico de células diferenciadas (setas vermelhas) e não diferenciadas (setas amarelas) a partir de calos de *Physalis ixocarpa* que apresentaram formações globulares aos 56 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo 50,0 μ M de 2,4-D. Observado na lente objetiva 10x.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que o 2,4-D é um regulador de crescimento bastante eficaz na indução de calos em *Physalis ixocarpa*, promovendo altas taxas de resposta. A formação de calos friáveis e estruturas globulares, especialmente em explantes foliares, mostra o potencial da espécie para aplicação em protocolos de embriogênese somática e regeneração *in vitro*. A análise histológica validou a observação morfológica, revelando que as formações globulares são compatíveis com tecidos embriogênicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As concentrações de 10 e 50 µM de 2,4-D foram mais eficientes na indução de calos em *Physalis ixocarpa*, especialmente em folhas e cotilédones, que apresentaram estruturas globulares indicativas de embriogênese. A análise histológica confirmou características celulares compatíveis com tecidos embriogênicos.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, Domitzel Zagal et al. In vitro morphogenesis of *Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e69416, 2022.
- CARVALHO, A. C. P. P. de et al. 2013. **Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais**. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed., Embrapa. 13-53 p.
- DELGADO-ALVARADO, E.A. et al. Potential of random amplified microsatellites (RAMS) to typify and discriminate varieties of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.30, p.396-403, 2018.
- DWITARA, Galuh Ayu Chantika et al. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and kinetin on callus induction and growth of *Physalis angulata* L. leaf explants. **Open Access Research Journal of Biology and Pharmacy**, v. 8, n. 2, p. 027-032, 2023.
- GAJ, M.D, et al. 2006. Mutantes de resposta hormonal de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. prejudicada na embriogênese somática. **Plant Growth Regulation**, 49, 183-197p.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.182-211.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, 15, 473-497p.
- O'BRIEN, T.P; FEDER, N; MCCULLY, M.E. 1964. Coloração policromática de paredes celulares vegetais por azul de toluidina. **Protoplasma**, 59, 368-373p.
- ROMERO-GUERRERO, F. Hypoglycemic and antioxidant effects of green tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) calyxes' extracts. **Journal of food biochemistry**, v. 45, e-13678, 2021.
- SILVA, T.S. et al. 2020. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, 30(3):700-717p.
- SILVEIRA, V; MACEDO, A; SANTA-CATARINA, C. 2013. Alterações morfológicas e do conteúdo de poliaminas em calos embriogênicos e não embriogênicos de cana-de-açúcar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 114(3): 351-364p.
- KHAN, W; BAKHT, J; SHAFI, M. Antimicrobial potentials of different solvent extracted samples from *Physalis ixocarpa*. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 29, p. 467-475, 2016.
- ZEIN EL DIN, Amal F. M. et al. Caracterização morfoanatômica e bioquímica de calos embriogênicos e degenerativos de *Phoenix dactylifera* L. **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 393, 2021.