



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológica

Curso de Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

Trabalho de Investigação

Efeito do balanço de concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire)

Autor:

Ciro Amaral Augusto Santana

Maputo, Março de 2025



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Curso de Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

Trabalho de Investigação

Efeito do balanço de concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire)

Autor:

Ciro Amaral Augusto Santana

Supervisores:

Prof. Doutor. Orlando Quilambo

Profª. Doutora. Célia Martins

Mestre Sónia Ventura Guilundo

Mestre Milton Pinho

Maputo, Março de 2025

Agradecimentos

Agradeço a Deus Todo-Poderoso por sempre olhar por mim e por permitir que eu chegasse à conclusão deste trabalho.

Aos meus supervisores, Prof. Doutor Orlando Quilambo, Prof^a. Doutora Célia Martins, Mestre Sónia Guilundo, e especialmente ao Mestre Milton Pinho, agradeço pelo apoio constante, orientação e acompanhamento durante o desafio da realização deste trabalho.

Ao Projecto VitroFlora-PASET/RSIF, que financiou este trabalho, e ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane, onde realizei este estudo e percorri minha formação de nível superior, expresso minha sincera gratidão. Agradeço também ao corpo docente, que proporcionou valiosas experiências e despertou em mim o interesse pela pesquisa científica.

Ao Senhor Simeão e Senhor António, que sempre se mostraram disponíveis para auxiliar na execução deste trabalho no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Ciências Biológicas, assim como aos técnicos Célia Mangué e José Matlombe do laboratório B1, que me acompanharam em grande parte da minha jornada académica, deixo minha sincera gratidão.

Aos meus colegas do DCB e amigos, e especialmente à turma do curso de Licenciatura em Biologia Aplicada de 2020, em particular a Paula Chilengue, Tonelda Mucavele, Ilda Nhampossa e Andrea Kenga, meu muito obrigado pelo companheirismo e incentivo.

À minha família, especialmente aos meus pais, José Santana e Josefina Santana, e aos meus irmãos, Célio Mole e Katopa Santana, pelo seu amor, apoio incondicional e confiança em mim ao longo desta jornada.

Agradeço, enfim, a todos que, de maneira directa ou indirecta, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho.

Declaração de honra

Eu, Ciro Amaral Augusto Santana, estudante do curso de licenciatura em Biologia Aplicada na Universidade Eduardo Mondlane, declaro por minha honra que o presente trabalho académico intitulado: “Efeito do balanço de concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire)”, foi por mim elaborado sob orientações dos meus supervisores de acordo com a metodologia descrita e com base nas referências bibliográficas mencionadas no mesmo.

Maputo, Março de 2025

(Ciro Amaral Augusto Santana)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais José Lino Santana e Josefina Mole Santana que sacrificaram o que não tinham para que me pudesse formar, e aos meus irmãos Célio Mole e Katopa Santana.

Epígrafe

"Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta."

Mateus 7:7

Resumo

A pesquisa investigou como diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) afectam a formação de *callus* e a regeneração de embriões somáticos em explantes de embriões de *Millettia stuhlmannii* Taub., uma madeira importante conhecida como jambire. Este estudo visa contribuir para o reflorestamento, considerando o abate massivo da espécie e as mudanças climáticas. O objectivo geral foi avaliar o impacto de diferentes concentrações de BAP e ANA na formação de *callus* e na indução de embriões somáticos em *Millettia stuhlmannii* Taub. Especificamente, procurou-se identificar o tempo necessário para a formação de *callus* e sua morfologia, comparar a eficácia das diferentes concentrações de reguladores de crescimento na formação de *callus*. Embriões de *Millettia stuhlmannii* Taub. foram excisados de sementes e inoculados em meios de cultivo contendo várias combinações e concentrações de BAP e ANA, variando de 0.5 a 2.0 mg/L para BAP e de 1.0 a 3.0 mg/L para ANA, em ambiente escuro a 24°C. O desenvolvimento do *callus* e a formação de embriões somáticos foram monitorados por 8 semanas. As combinações específicas de BAP e ANA foram eficazes na indução de *callus* e embriões somáticos. O *callus* embriogénico começou a se formar na terceira semana, apresentando coloração amarela, transparente e uma textura compacta e friável. A presença de contaminação afectou a formação de *callus* e embriões e os explantes. Os reguladores BAP e ANA demonstraram eficácia na formação de *callus* e embriões somáticos, embora o balanço entre eles não tenha mostrado diferença significativa, demonstrando que embriões desta espécie são bons explantes e que os reguladores são adequados para a formação de *callus* e embriões somáticos. Estes resultados contribuem para o estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* para *callus* e facilitar a propagação e conservação da espécie.

Palavras-chave: conservação, cultivo *in vitro*, madeira, *Millettia stuhlmannii*, reflorestamento, regeneração.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIB	ácido indol-3-butirico
AIA	ácido indolacético
°C	Graus Celsius
ANA	Ácido naftaleno acético
atm	Atmosfera (unidade de pressão)
BAP	6-benzilaminopurina
CIF	Centro de Investigação Florestal
g	gramas
L	Litro
mg/L	miligrama por litro
ml	mililitro
min	minutos
MS	Murashige e Skoog
2,4 D	2,4-diclorofenoxiacético

Lista de Figuras

Figura 1: Aspectos morfológicos da <i>M. stuhlmannii</i> . A, árvore adulta. B, folhas. C, Fruto (vagem). Fonte: Autor (2024).....	5
Figura 2: Embriogénese somática e organogénese em cultura de tecidos. A, Embriogénese somática directa e indirecta. B, Organogénese directa e indirecta. Fonte: Adaptado de Long <i>et al.</i> , 2022.	10
Figura 3: Mapa da cidade de Maputo destacando a localização do laboratório de cultura de tecidos da Universidade Eduardo Mondlane.	15
Figura 4: Fluxograma de actividades do estudo da indução de <i>callus</i> a partir de embriões zigóticos de <i>M. stuhlmannii</i>	19
Figura 5: Formação e envelhecimento do <i>callus</i> a partir de embriões zigóticos de <i>Millettia stuhlmannii</i> Taub. ao longo de 8 semanas.	21
Figura 6: Percentagem de indução de <i>callus</i> em resposta a diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA designados T1, T2 e T3.....	22
Figura 7: Características morfológicas iniciais dos <i>calli</i> formados. A-B, explante com <i>callus</i> friável de coloração amarela. C, explante com <i>callus</i> friável de coloração transparente.	23
Figura 8: Formação de <i>callus</i> e presença de embriões somáticos. A, explante sem <i>callus</i> exibindo a presença de embrião somático. B, explante com <i>callus</i> exibindo a presença de embrião somático.	24
Figura 9: Percentagem de explantes com e sem <i>callus</i> que desenvolveram embriões somáticos em cada tratamento. Sendo T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L), T2 (BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L) e T3 (BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L).	24
Figura 10: Contaminação do meio de cultura. Camada esbranquiçada em volta do explante, indicando presença de contaminação.	25
Figura 11: Câmara de fluxo laminar.....	49
Figura 12: Sala de crescimento.....	49
Figura 13: Sala de preparação.	50
Figura 14: Sementes incubadas em placas de Petri forradas com papel de filtro humedecido com água destilada de modo a facilitar a retirada do tegumento.....	50
Figura 15: Excisão do embrião zigótico (explante) dos cotilédones.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentrações combinadas de reguladores de crescimento para o meio de indução de <i>callus</i> a partir de sementes de <i>M. stuhlmannii</i>	17
Tabela 2: Características iniciais dos <i>calli</i> formados em cada tratamento.	23
Tabela 3: Número de explantes com <i>callus</i> e sem <i>callus</i> em cada tratamento.....	52
Tabela 4: Análise de dados relativos a frequência de indução de <i>callus</i> . Teste Exacto de Fisher feito no GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).....	52
Tabela 5: Número de explantes com embriões somáticos com <i>callus</i> e sem <i>callus</i> em cada tratamento.	53
Tabela 6: Análise de dados relativos a presença e ausência de embriões somáticos em explantes com <i>callus</i> e sem <i>callus</i> por cada tratamento. Teste Exacto de Fischer feito no GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).....	53

Índice

Agradecimentos	I
Declaração de honra	II
Dedicatória.....	III
Epígrafe	IV
Resumo	V
Lista de Abreviaturas e Siglas	VI
Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas	VIII
1. Introdução.....	1
1.1. Problema	2
1.2. Justificativa	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. <i>Millettia stuhlmannii</i> Taub.....	5
2.2. Cultura de Tecidos	6
2.2.1. Aspectos gerais da cultura de tecidos	6
2.2.2. Meio de cultura.....	7
2.2.3. Reguladores de crescimento	8
2.3. Regeneração <i>in vitro</i>	10
2.3.1. Organogénese	10
2.3.2. Embriogénese Somática	11
2.3.3. Calogénese.....	11
3. Objetivos.....	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específicos	13
4. Hipóteses	13
4.1. Nula.....	13

4.2.	Alternativa.....	14
5.	Metodologia.....	15
5.1.	Área de estudo.....	15
5.2.	Materiais	16
5.2.1.	Equipamentos para protecção individual.....	16
5.2.2.	Material laboratorial	16
5.2.3.	Equipamento laboratorial	16
5.2.4.	Reagentes e soluções	16
5.3.	Procedimento	17
5.3.1.	Obtenção do explante	17
5.3.2.	Preparação dos meios de cultura	17
5.3.3.	Isolamento e esterilização de superfície do explante.....	18
5.3.4.	Inoculação e incubação.....	18
5.3.5.	Fluxograma de actividade laboratorial	19
5.3.6.	Análise de dados.....	19
6.	Resultados.....	21
6.1.	Efeito das combinações de BAP e ANA na indução de <i>callus</i> em <i>Millettia stuhlmannii</i> Taub.	21
6.2.	Efeito das combinações de BAP e ANA na morfologia do <i>callus</i> em <i>Millettia stuhlmannii</i> Taub.	22
7.	Discussão.....	26
7.1.	Efeito das combinações de BAP e ANA na indução do <i>callus</i>	26
7.2.	Efeito das Combinações de BAP e ANA na morfologia do <i>callus</i>	27
7.3.	Efeito da presença de contaminação	29
8.	Conclusão	31
9.	Limitações	32
10.	Recomendações	33
11.	Referências Bibliográficas.....	34

12.	Anexos	49
-----	--------------	----

1. Introdução

Millettia stuhlmannii Taub. (Jambirre) é uma espécie de árvore de porte elevado, alcançando até cerca de 35 metros de altura. Pode ser encontrada em florestas do sul da Tanzânia, Zimbabué e Moçambique. É muito apreciada pela sua madeira de qualidade e resistente (Hyde *et al.*, 2024; Louppe, 2008). Pelo facto de ser uma das principais árvores madeiras exploradas em Moçambique, o seu número tem reduzido significativamente (Magalhães, 2014). É uma das espécies madeiras em Moçambique com maior índice de valor de combustível (Cuvilas *et al.*, 2014), sendo localmente utilizada como fonte de lenha (Bruschi *et al.*, 2014).

A propagação por sementes é o método mais utilizado para propagação das espécies lenhosas (Winkelmann, 2013). Este processo consiste na germinação que inicia com a embebição da semente e termina com a emergência da radícula (Han e Yang, 2015). Em contrapartida a cultura de tecidos vegetais é uma das tecnologias de regeneração mais usadas, baseando-se na embriogénese somática e organogénese *de novo*. A embriogénese somática pode ser directa, quando é feita a partir de células somáticas, ou indirecta, quando é primeiro realizada a etapa de formação de *callus* embrionários (Long *et al.*, 2022).

Callus corresponde a uma massa celular desorganizada que surge em resposta à estímulos bióticos e abióticos (Ikeuchi *et al.*, 2013). Para que essa massa celular se forme, várias partes da planta podem ser utilizadas como folhas, caules, raízes, flores e sementes, importando a idade da planta, na altura em que se extrai o explante, e a espécie vegetal (Bathia, 2015).

Os factores que contribuem para a formação de *callus* variam de espécie para espécie (Efferth, 2019; Park, 2021). O *callus* geralmente é formado a uma temperatura de cerca 25° C, havendo espécies que necessitam de uma condição completa de escuro, enquanto outras requerem um fotoperíodo específico. Variáveis como o pH do meio, o tipo de meio de nutritivo, e por vezes reguladores de crescimento são também fundamentais (Efferth, 2019).

A combinação de concentrações de reguladores de crescimento, como auxina e citoquinina, tem a capacidade de induzir a formação de *callus* (Ikeuchi *et al.*, 2013; Sudheer *et al.*, 2022). Dentre os reguladores de crescimento comumente usados na cultura

in vitro de espécies lenhosas, destacam-se o ácido naftaleno acético (ANA) e o 6-benzilaminopurina (BAP) que são os preferenciais para estudos com esse grupo de plantas (Jayusman *et al.*, 2022).

Uma vez formados, o *callus* pode ser utilizado para regenerar plântulas inteiras, sendo uma fonte de células para a produção massiva de plantas (Kyte *et al.*, 2013) e também células que são usadas para produção de metabólitos secundários e plantas geneticamente modificadas para vários fins (Efferth, 2019).

No geral, a propagação de espécies lenhosas, usando a técnica de cultura de tecidos, tem tido um desenvolvimento lento devido à vários desafios fisiológicos, embora alguns protocolos têm estado a ser estabelecidos específicos para a espécie (McCown, 2021).

O presente trabalho tem como finalidade avaliar o efeito da combinação de BAP e ANA, na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *M. stuhlmannii*.

1.1. Problema

O número de plantas nativas tem vindo a reduzir devido ao desflorestamento. Em Moçambique, algumas dessas espécies já chegaram ao nível de serem consideradas em vias de extinção, o que leva aos especialistas a buscar estratégias para reduzir esse fenómeno (MITADER, 2018b, Odorico *et al.*, 2022).

A demanda dos mercados nacionais e internacionais pela madeira *M. stuhlmannii*, nos últimos anos, fez com que o nível de exploração anual permitido, ou corte anual admissível por lei reduzisse em mais de 50%, de modo a manter o uso sustentável da espécie (MITADER, 2018a).

Em parte, isto deve-se ao facto de que cerca de 85% do uso nacional da madeira cingir-se apenas a três espécies, sendo a *M. stuhlmannii* uma delas (Magalhães, 2014).

A planta de *M. stuhlmannii*, para atingir o diâmetro mínimo de corte, necessita de cerca de 60 a 70 anos (Hofiço, 2021). Isto indica que são necessárias várias décadas para que se volte a usar os recursos que esta espécie pode oferecer, isso se o Homem pautar pela recuperação destes recursos, algo que não é frequente.

O alto nível de desflorestamento e a baixa reposição desta espécie surge como um catalisador para a redução do número populacional desta espécie. Embora a cultura de tecidos vegetais seja uma alternativa de relevo, pois permite produzir alto número de

mudas viáveis em curto espaço de tempo (Hussain *et al.*, 2012), ainda não existem protocolos que permitem a propagação dessa espécie *in vitro*. A necessidade de criar um protocolo para a micropropagação desta espécie, inquieta, por isso, se levanta a seguinte questão de partida:

- Qual é o efeito do balanço de concentração de BAP e ANA na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire) como explante?

1.2. Justificativa

A área florestal global corresponde a cerca de 4,06 bilhões de hectares (FAO, 2020). A perda líquida de florestas anual no mundo foi de cerca de 4.7 milhões de hectares entre 2010 – 2020, sendo África o continente com maior taxa anual de perda líquida de florestas com 3.9 milhões de hectares no mesmo período, tendo um aumento progressivo ao longo dos anos (FAO, 2020; FAO 2022). Moçambique possui cerca de 34 milhões de hectares de área florestal, sendo registada uma taxa anual de perda líquida de quase 267 mil hectares entre os anos de 2003 e 2013 (MITADER, 2018b).

A agricultura e o consumo de combustíveis lenhosos constituem os principais factores que contribuem para o desflorestamento em Moçambique. Outros aspectos como o aumento demográfico, a urbanização e desenvolvimento económico também fazem parte da lista (Joaquim-Meque *et al.*, 2023, MITADER, 2018b; Mabilana, 2019).

Esse desflorestamento faz com que parte do património florestal e da biodiversidade da flora nacional, em geral, se perca. Com isso, cerca de 119 espécies de flora moçambicana de plantas vasculares já se encontram em perigo de extinção (Odorico *et al.*, 2022).

Importa sublinhar, também, que a extração de madeira em Moçambique ultrapassa os limites permitidos estabelecidos por lei, sendo a maior parte realizada de forma ilegal e não registada, resultando em uma subestimação significativa do volume real de madeira extraída (Magalhães, 2014).

Este facto contribui para que haja uma enorme redução no número populacional das espécies madeireiras nativas, sem a actual noção da situação das mesmas. O que exige que surjam planos para minimizar os danos que essas actividades geram.

Para além das legislações e limitações relativas a concessões para a exploração desses recursos, uma das estratégias a adoptar é o reflorestamento. A recuperação desse património florestal não só irá evitar que essas espécies fiquem extintas, mas também permitirá que sejam extraídos benefícios destes recursos florestais.

Relativamente a propagação dessas espécies, uma técnica apresenta-se como a ideal, que é a cultura de tecidos, que se mostra vantajosa em relação a propagação convencional por semente, pois permite a obtenção rápida de mudas de alta qualidade e melhoradas (Chang *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2012).

No entanto, são escassos os protocolos, o que torna a técnica difícil de aplicar. A especificidade da metodologia ao restringir-se apenas a um grupo de espécies, se não uma única espécie, faz com que haja a necessidade de se realizar mais investigações focando em determinadas espécies de interesse.

Havendo poucas pesquisas relacionadas a cultura de tecidos de espécies lenhosas, e quase nenhuma que envolva as espécies nativas de Moçambique, é importante que se realize este estudo. A execução da investigação facultará dados que irão permitir o estabelecimento de culturas de *callus* que poderão possibilitar a regeneração da espécie, assim como a aplicação noutros processos biotecnológicos.

Os resultados desta pesquisa poderão, ainda, servir de base para a realização de outros estudos que façam uso da técnica de cultura de tecidos em espécies lenhosas nativas. Dessa forma, este estudo constitui um contributo relevante para a o conhecimento científico da técnica de cultura de tecidos com a *M. stuhlmannii*, possibilitando sua propagação massiva e apresentando-se como uma proposta viável para a degradação florestal existente em Moçambique.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Millettia stuhlmannii* Taub.

A *Millettia stuhlmannii* Taub. é uma espécie de porte arbóreo que pertence a família Fabaceae, subfamília Papilionoideae (Hyde *et al.*, 2024; Palgrave *et al.*, 2002). Ela ocorre em florestas caducifólias de altitude até 900 metros, desenvolvendo-se melhor em regiões com pluviosidade elevada e ribeirinhas. A sua distribuição é restrita às regiões do Zimbabué, Tanzânia e Moçambique (Louppe, 2008; Mtshali e Mathalauga, 2023; Palgrave *et al.*, 2002).

A espécie apresenta porte de volume médio e coroa espalhada, atingindo até 35 metros de altura. O tronco, que pode ser recto ou torto, atinge um diâmetro de até 150 cm, e a casca possui uma coloração amarela ou cinza esverdeada (figura 1A) (Louppe, 2008; Palgrave *et al.*, 2002).



Figura 1: Aspectos morfológicos da *M. stuhlmannii*. A, árvore adulta. B, folhas. C, Fruto (vagem). Fonte: Autor (2024).

As folhas são grandes, verdes e caducifólias, com padrão alternado e composto, apresentando entre 7 - 9 pares de folíolos de tamanhos variados (figura 1B). As flores são bissexuais, com pedicelos de até 9 milímetros e duas bractéolas no ápice, atingindo 13

milímetros de comprimento. Têm formato de ervilha e coloração lilás, e surgem no início da estação chuvosa, de Novembro à Janeiro (Louppe, 2008; Mtshali e Mathalauga, 2023; Palgrave *et al.*, 2002).

O fruto é uma vagem achatada e oblanceolada, linear e plana, com cerca de 25 cm de comprimento, com coloração castanha-amarelada e parede rígida. É deiscentes e contém 6 à 8 sementes (figura 1C) (Louppe, 2008; Palgrave *et al.*, 2002). As sementes são achatadas, lisas e ovóides com um pequeno arilo na base, e possuem coloração castanha (Louppe, 2008).

As raízes são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças estomacais; contudo, é a madeira que se destaca pelo seu valor utilitário. Esta madeira é castanha escura ou quase preta, de granulação fina, bastante durável e resistente à fungos. Em Moçambique, é considerada de madeira de primeira classe e valorizada tanto no mercado nacional e internacional, com múltiplas aplicações na indústria de transformação (Fern, 2024; Louppe, 2008; MITADER, 2018a; Palgrave *et al.*, 2002).

A população de *M. stuhlmannii* tem vindo a decrescer nos últimos anos, em Moçambique, devido à actividades antropogénicas assim com sob exploração e o abate ilegal, levando a recomendação de medidas com vista a preservação da espécie (MITADER, 2018a).

2.2. Cultura de Tecidos

2.2.1. Aspectos gerais da cultura de tecidos

A cultura de tecido vegetal constitui uma técnica baseada no cultivo *in vitro* de órgãos ou células vegetais em meio de cultura, sob condições assépticas e ambiente controlado (Thorpe, 2006). Esta técnica baseia-se no princípio da totipotência, que é a capacidade que as células vegetais têm de gerar uma nova planta a partir de células somáticas, por reprogramação ou desdiferenciação destas em células totipotentes (Su *et al.*, 2021).

O pedaço de tecido vegetal inserido no meio de cultura é designado por explante e pode ser constituído por folhas, flores, caules, hipocótilos, cotilédones, embriões ou outras partes da planta (Park, 2021). Durante processos de regeneração, estas células vegetais, quando expostas a certas condições, passam por uma transformação que as leva a um estado semelhante ao das células-tronco tornando-se mais jovem e pluripotente, por um

processo conhecido como desdiferenciação (Grafi, 2004; Grafi e Barak, 2015; Sugiyama, 2015).

Essa capacidade totipotente e pluripotente surge devido a exposição a factores como a lesão do explante, reguladores de crescimento e estímulos ambientais que por meio da influência em certas vias de sinalização das plantas tendem a ditar a capacidade regeneração (Bidabadi e Jain, 2020; Xu e Hu, 2020).

Deste modo, a composição do meio de cultura e as condições ambientais podem exercer um *stress* que, além de influenciar a resposta fisiológica natural da planta, afecta elementos epigenéticos da espécie, impactando o resultado do experimento *in vitro* (Bednarek e Orłowska, 2020; Us-Camas *et al.*, 2014).

A cultura de tecidos é uma técnica valiosa para a micropropagação de plantas, especialmente as recalcitrantes aos métodos de propagação convencionais (Hernández-García *et al.*, 2021; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo, 2018; Upadhyay *et al.*, 2015). Além disso, esta técnica tem sido empregada noutras áreas como a engenharia genética para o desenvolvimento de cultivares com características desejadas (Van Eck *et al.*, 2019), a produção de compostos bioactivos em grande escala (Espinosa-Leal *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017) e a conservação de germoplasma (Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo, 2018).

2.2.2. Meio de cultura

O meio de cultura é o substrato onde o explante é colocado e a sua composição, geralmente, compreende uma fonte de carbono, vitaminas, aminoácidos, nutrientes, reguladores de crescimento, agentes gelificantes e água, podendo também ser sujeitos a adição de antimicrobianos (Gamborg *et al.*, 1976; Park, 2021).

A quantidade de agentes gelificantes como Agar ou *Gellan gum*, assim como seus derivados em sua composição é que determinam se o meio será líquido, semissólido ou sólido. A escolha de um ou de outro varia e pode influenciar o resultado da experiência (Kaçar *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2021; Palanyandy *et al.*, 2020).

O meio de cultura é onde o explante ou a planta encontra todas as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento *in vitro*. Dependendo de diversos factores, existem vários meios basais que podem ser utilizados como pontos de partida na optimização de

protocolos como Murashige-Skoog medium, Wood Plant Medium e DKW medium (Philips e Garda, 2019).

Um dos meios mais utilizados é o meio Murashige - Skoog (MS), e sua composição compreende uma concentração específica de micronutrientes, macronutrientes e alguns compostos orgânicos (Murashige e Skoog, 1962). Várias modificações tem sido feitas desde o seu estabelecimento através a redução ou adição de certos constituintes para acomodar a certas necessidades (Chandrasekhar *et al.*, 2005; Dalton, 2020; Ozias-Akins, 1989; Zhou *et al.*, 2023).

Dentre os elementos adicionados ao meio de cultura basal, destacam-se os reguladores de crescimento que actuam como estimuladores de resposta morfogénica dos explantes. O tipo e quantidade desses reguladores no meio varia dependendo da etapa e do objectivo que se pretende atingir em vários protocolos de cultura *in vitro* (Huang *et al.*, 2017; Kok *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

2.2.3. Reguladores de crescimento

Reguladores de crescimento, também designadas hormonas vegetais, são definidos como substâncias que, em baixas concentrações, em actividades de metabolismo e fisiologia da planta, podendo ser de origem natural ou sintética (Bhatla e Lal, 2023; Vieira *et al.*, 2010). São caracterizados pela capacidade de influenciar uma resposta fisiológica podendo estimular, inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo também influenciado por aspectos genéticos das espécies e factores abióticos onde o mesmo se encontra (Vieira *et al.*, 2010).

O ramo da acção dos reguladores de crescimento vegetais pode ser directa ou indirecta pela interação com outras hormonas ou com outros factores ambientais, servindo como mensageiros químicos, estimulando ou reprimindo genes específicos (Raven *et al.*, 2013). Essas substâncias incluem os grupos das citocininas, auxinas, giberelinas, etileno e brassinoteroides (Bhatla e Lal, 2023; Vieira *et al.*, 2010).

A auxina é uma hormona de crescimento cuja principal função é o alongamento e incremento do volume celular (Normanly *et al.*, 2010). Na planta, está envolvida em processos relacionados com a formação de raízes secundárias, a diferenciação vascular, a formação de brotos axilares, flores e frutos (Hopkins e Huner, 2008; Raven *et al.*, 2013).

O ácido indolacético (AIA) e o ácido indol-3-butírico (AIB) são as auxinas naturais que ocorrem mais em plantas (Gomes *et al.*, 2021). Dentre as auxinas sintéticas destacam-se o ANA e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) que têm várias aplicações biotecnológicas (Raven *et al.*, 2013).

O ANA é comumente utilizado em cultura de tecidos para a indução de raízes (Kentelky *et al.*, 2021; Samim *et al.*, 2021). Outros usos envolvem a indução a formação de *callus* e embriões somáticos. O ANA é usado de maneira singular ou em conjunto com outras auxinas e citocininas para estimular a morfogênese vegetal (Wu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020).

A citocinina é uma hormona de crescimento cuja função fundamental é a estimulação da divisão celular (Hopkins e Huner, 2008). As citocininas estão associadas em processos relacionados com a formação de ápices e reduzem a senescência nas plantas (Hopkins e Huner, 2008; Salisbury e Ross, 1992).

A citocinina natural mais comum é a Zeatina (Le Bris, 2017), sendo a BAP e a Cinetina as citocininas sintéticas mais utilizadas (Raven *et al.*, 2013).

A BAP é geralmente adicionada ao meio de cultura, de maneira isolada ou em conjunto com outros reguladores de crescimento, com o propósito de estimular a formação de ápices (Kharel *et al.*, 2022; Ling *et al.*, 2018), assim como os processos de embriogênese somática e calogênese (Chakraborty *et al.*, 2022; Nordine *et al.*, 2014).

A presença de auxinas e citocininas em quantidades quase similares no meio de cultura suscitam a formação do *callus*, sendo que quando há maior presença de auxina em relação a citocininas resulta a formação de raízes, e o contrário induz a formação de ápices (Hopkins e Huner, 2008; Ikeuchi *et al.*, 2013).

As combinações das hormonas auxina e citocinina é que dita o caminho de morfogênese que a espécie irá seguir, sendo específica para a espécie e o explante a utilizar (Akinropo *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020).

2.3. Regeneração *in vitro*

2.3.1. Organogénese

A organogénese, em cultura de tecidos, corresponde ao processo de formação de novos órgãos vegetais como os ápices e as raízes (Davey, 2017). Ela é realizada frequentemente tendo embriões zigóticos ou plântulas como explante inicial, tornando-se mais difícil com árvores mais velhas (Munoz-Concha, 2017).

A presença de reguladores de crescimento é o principal factor que induz o processo de organogénese em cultura de tecidos (Venkataiah *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). O processo de organogénese pode ocorrer de forma directa, sem a formação de *callus*, ou de forma indirecta, quando há a formação de *callus* antes do desenvolvimento de novos órgãos (figura 2B) (Costa *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2021).

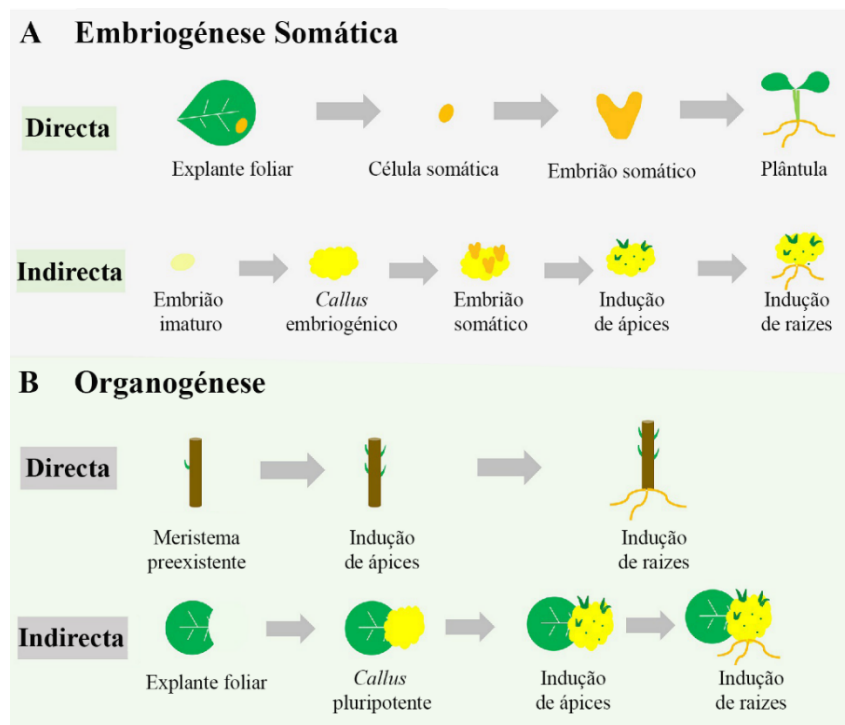


Figura 2: Embriogénese somática e organogénese em cultura de tecidos. **A,** Embriogénese somática directa e indirecta. **B,** Organogénese directa e indirecta. **Fonte:** Adaptado de Long *et al.*, 2022.

A organogénese é fundamental para a regeneração *in vitro*, servindo de base para a produção de novas plantas inteiras através da micropropagação, sendo possível obter várias mudas a partir de um único explante (Canhoto, 2010).

2.3.2. Embriogênese Somática

Embriogênese somática corresponde ao processo pelo qual os embriões são formados a partir de células somáticas (Canhoto, 2010). Os embriões somáticos diferem dos embriões zigóticos em sua origem, pois os primeiros derivam de células somáticas, enquanto os zigóticos resultam da fusão de gametas (Bhatia, 2015).

A formação de embriões somáticos não é natural e acontece mediante alguma estimulação como a adição de reguladores de crescimento vegetais (Gao *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2015), o stress e outros componentes do meio de cultura (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Lema-Rumińska *et al.*, 2013; Meneses *et al.*, 2005).

O uso de explantes jovens, principalmente embriões zigóticos, é preferencial para a embriogênese somática, sendo os explantes mais adultos mais resistentes a indução (George *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2016). O tamanho do explante e o genótipo da planta também são factores que pode podem interferir no sucesso ou não do processo (Singh e Kumari, 2015; Gulzar *et al.*, 2020).

O processo de embriogênese somática pode ser realizado de maneira directa, sem a intervenção de *callus* ou de maneira indirecta passando pela formação de *callus* (figura 2A) (Gaj, 2001; Kong e Shen, 2014).

A técnica da embriogênese somática é valiosa para regeneração de plantas inteiras, sendo útil na produção de mudas idênticas a planta mãe (Liu *et al.*, 2021; Venkataiah *et al.*, 2016). Outros usos incluem a produção de sementes sintéticas (Kumar e Chandra, 2014; Salma *et al.*, 2019) e a transformação genética (Cano *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2014).

2.3.3. Calogénese

O termo *callus* pode ser definido como uma massa desorganizada de células que surge em resposta à infecção por patógeno, dano físico do explante ou à exposição a reguladores de crescimento vegetais (Ikeuchi *et al.*, 2013; Park, 2021). A massa celular desdiferenciada do *callus* tem capacidade de gerar outros órgãos vegetais e ápices, devido a sua característica totipotente (Gumulak-Wołoszyn *et al.*, 2024; Ren *et al.*, 2020; Reyes-Díaz *et al.*, 2017).

Em cultura de tecidos, a indução ao *callus* é maioritariamente realizada pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (Ikeuchi *et al.*, 2013). Os reguladores de

crescimento geralmente empregados nas experiências fazem parte do grupo das auxinas e das citocininas (Azad *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2022).

O tipo e o equilíbrio das auxinas e das citocininas são factores fundamentais para a indução de *callus*, variando conforme espécie (Abbas *et al.*, 2018; Akinropo *et al.*, 2020; Corredoira *et al.*, 2012). Assim como a embriogénese somática, explantes mais jovens demonstram maior facilidade na indução de *callus*, sendo que diferentes tipos de explantes podem também responder de forma distinta dentro da mesma espécie (George *et al.*, 2007; Subasinghe *et al.*, 2016; L. Zhang *et al.*, 2019).

A cultura de *callus* é útil para várias aplicações biotecnológicas. Ela tem sido utilizada como etapa intermedia para a regeneração de plantas inteiras (Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2018), a produção indirecta de embriões somáticos (Hu *et al.*, 2017; Xu e Hu, 2020), a produção de compostos bioactivos (Coskun *et al.*, 2019; Ghorbanpour e Hadian, 2015), a transformação genética (Chib *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2024) e conservação de germoplasma (Shahrour *et al.*, 2024; Whiteley *et al.*, 2016).

3. Objetivos

3.1. Geral

- ❖ Avaliar o efeito do balanço das concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA na indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire).

3.2. Específicos

- ❖ Determinar o tempo necessário para o início de formação e esmorecimento do *callus*.
- ❖ Determinar a frequência de indução de *callus* formados em diferentes balanços de concentração de BAP e ANA.
- ❖ Comparar o efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na frequência de indução de *callus*.
- ❖ Descrever a morfologia dos *callus* formados em diferentes balanços de concentração de BAP e ANA.
- ❖ Descrever o efeito da presença de contaminação na indução de *callus* e de embriões somáticos.

4. Hipóteses

Predição: As várias partes das plantas têm a capacidade de servir como explantes para experiências de regeneração de tecidos vegetais *in vitro*. A combinação de auxinas e citocininas resulta na indução de calos (Sudheer *et al.*, 2022) ou na formação de embriões somáticos (Nic-Can e Loyola-Vargas, 2016). Assim, colocam-se as seguintes hipóteses:

4.1. Nula

- ❖ O balanço de concentração de BAP e ANA não possui influência no processo de indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire).

4.2. Alternativa

- ❖ O balanço de concentração de BAP e ANA possui influência no processo de indução de *callus* a partir de embriões de *Millettia stuhlmannii* Taub. (Jambire).

5. Metodologia

5.1. Área de estudo

O estudo foi realizado no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Ciências Biológicas, pertencente à Faculdade de Ciências Da Universidade Eduardo Mondlane. O laboratório está localizado no Campus principal da Universidade Eduardo Mondlane, distrito Municipal Kampfumo, Av. Julius Nyerere, nº 3453, C. Postal nº 257.

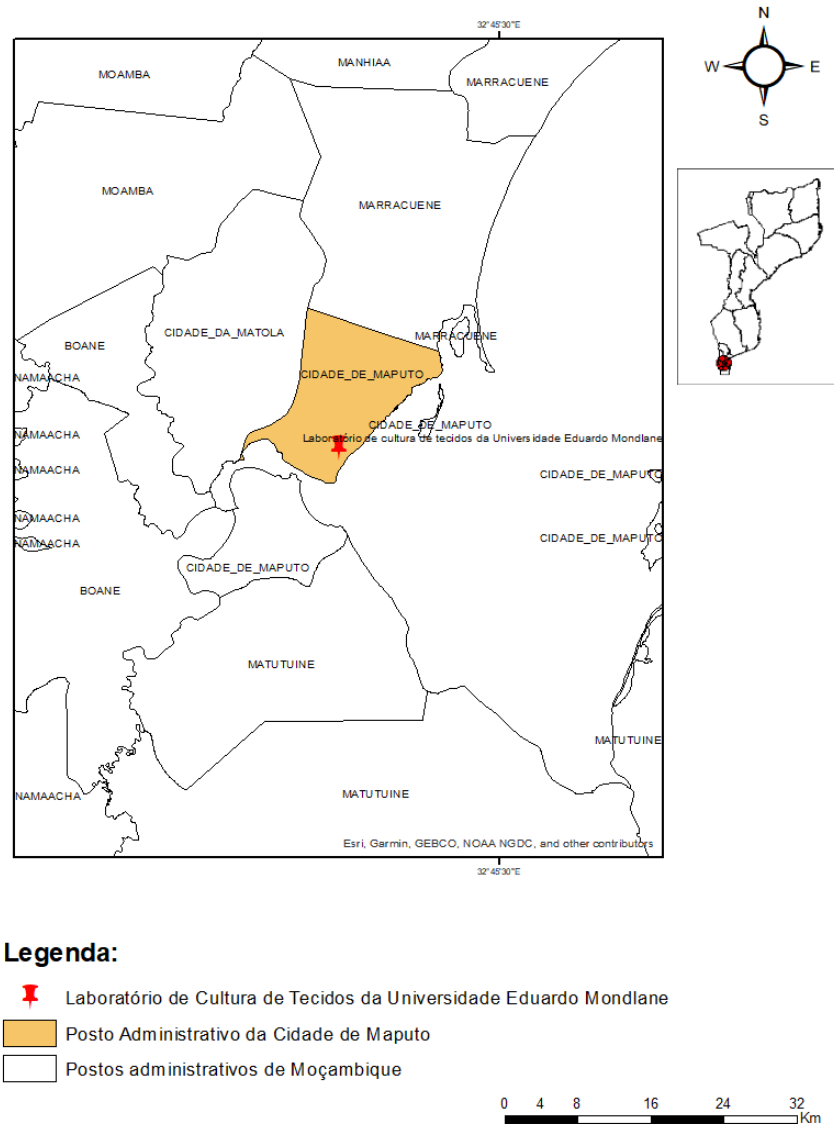


Figura 3: Mapa da cidade de Maputo destacando a localização do laboratório de cultura de tecidos da Universidade Eduardo Mondlane.

5.2. Materiais

5.2.1. Equipamentos para protecção individual

- ❖ Bata de mangas cumpridas.

5.2.2. Material laboratorial

- ❖ Frascos de meio de cultura de 150 ml
- ❖ Bisturi;
- ❖ Pinça recta;
- ❖ Pipetas;
- ❖ Papel de filtro;
- ❖ Micropipetas;
- ❖ Pipetador automático;
- ❖ Micro espátula;
- ❖ Copos de beaker graduados;
- ❖ Garrafas de solução stock;
- ❖ Lamparina.

5.2.3. Equipamento laboratorial

- ❖ Agitador Magnético;
- ❖ Câmara de fluxo laminar;
- ❖ pH metro de bancada;
- ❖ Balança analítica;
- ❖ Autoclave;
- ❖ Microondas;
- ❖ Estufa;

5.2.4. Reagentes e soluções

- ❖ Ácido naftaleno acético (ANA) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd, India);
- ❖ 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany);
- ❖ Meio Murashige e Skoog (© Duchefa Biochemie, Netherlands);

- ❖ Sacarose (© Glassworld, South Africa)
- ❖ Ágar;
- ❖ Tween 20 (© Minema Chemicals, South Africa);
- ❖ Álcool absoluto;
- ❖ Hipoclorito de sódio;
- ❖ Ácido clorídrico;
- ❖ Ácido ascórbico;
- ❖ Hidróxido de sódio.

5.3.Procedimento

5.3.1. Obtenção do explante

As sementes de *Milletia stuhlmanni* Taub. foram adquiridas no Centro de Investigação Florestal (CIF), localizado em Marracuene, distrito da província de Maputo, Moçambique.

5.3.2. Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados sendo a sua composição meio MS, com cerca de 3% de sacarose e com uma concentração de 20 mg/L de ácido ascórbico. Além disso, foram adicionadas diferentes combinações de reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (Ácido naftaleno acético), geradas a partir de outros estudos com espécies florestais (Azad *et al.*, 2005; Marisa *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020), que distinguiram os tratamentos conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações combinadas de reguladores de crescimento para o meio de indução de *callus* a partir de sementes de *M. stuhlmannii*.

Tratamento	Reguladores de crescimento ^a	
	BAP	ANA
T ₁	0.5	1.0
T ₂	1.0	2.0
T ₃	2.0	3.0

Nota. ANA = Ácido naftaleno acético; BAP = 6-benzilaminopurina.

^a Unidade de medida em miligramas por litro (mg/L).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8, sendo distribuídos 15 ml de meio em cada frasco. Tanto o meio quanto a água destilada foram autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão por um período de 20 minutos.

5.3.3. Isolamento e esterilização de superfície do explante

Na sala de preparação, para isolar os embriões zigóticos a partir das sementes de jambirre, os tegumentos foram cortados lateralmente com um bisturi e as sementes incubadas durante dois dias em placas de Petri forradas com papel de filtro humedecido com água destilada para facilitar a retirada do tegumento. Após a qual foram separados os embriões dos cotilédones e colocados num copo de beaker.

Os embriões excisados foram lavados em água por 15 minutos e depois imersos numa solução com hipoclorito de sódio a 10% e Tween 20, tendo sido agitadas manualmente durante 5 minutos. Em seguida, foram submetidos a três lavagens com água corrente.

Na sequência, na câmara de fluxo laminar, os embriões foram mergulhados em álcool a 70% por 1 minuto e depois lavados por 5 vezes com água destilada (Marisa *et al.*, 2021).

5.3.4. Inoculação e incubação

Os embriões foram inoculados nos frascos meio de cultura correspondentes aos três tipos de tratamento. Foi alocado apenas um explante em cada frasco de maneira aleatória, utilizando um delineamento experimental completamente causalizado (Compton, 2012; Golle *et al.*, 2020; Raj *et al.*, 2020). Foram realizadas 10 repetições por cada tratamento, totalizando 30 unidades experimentais, valor que satisfaz o número mínimo utilizado em estudos dessa natureza (Golle *et al.*, 2020; Raj *et al.*, 2020).

Os explantes foram incubados numa sala de crescimento a uma temperatura de 24° C, num fotoperíodo total de escuro e observados a cada 3 dias durante 8 semanas (Dalila *et al.*, 2012; Marisa *et al.*, 2021). Os parâmetros registados foram as características morfológicas e formação de *callus*, a formação de embriões somáticos e a presença de contaminação.

5.3.5. Fluxograma de actividade laboratorial

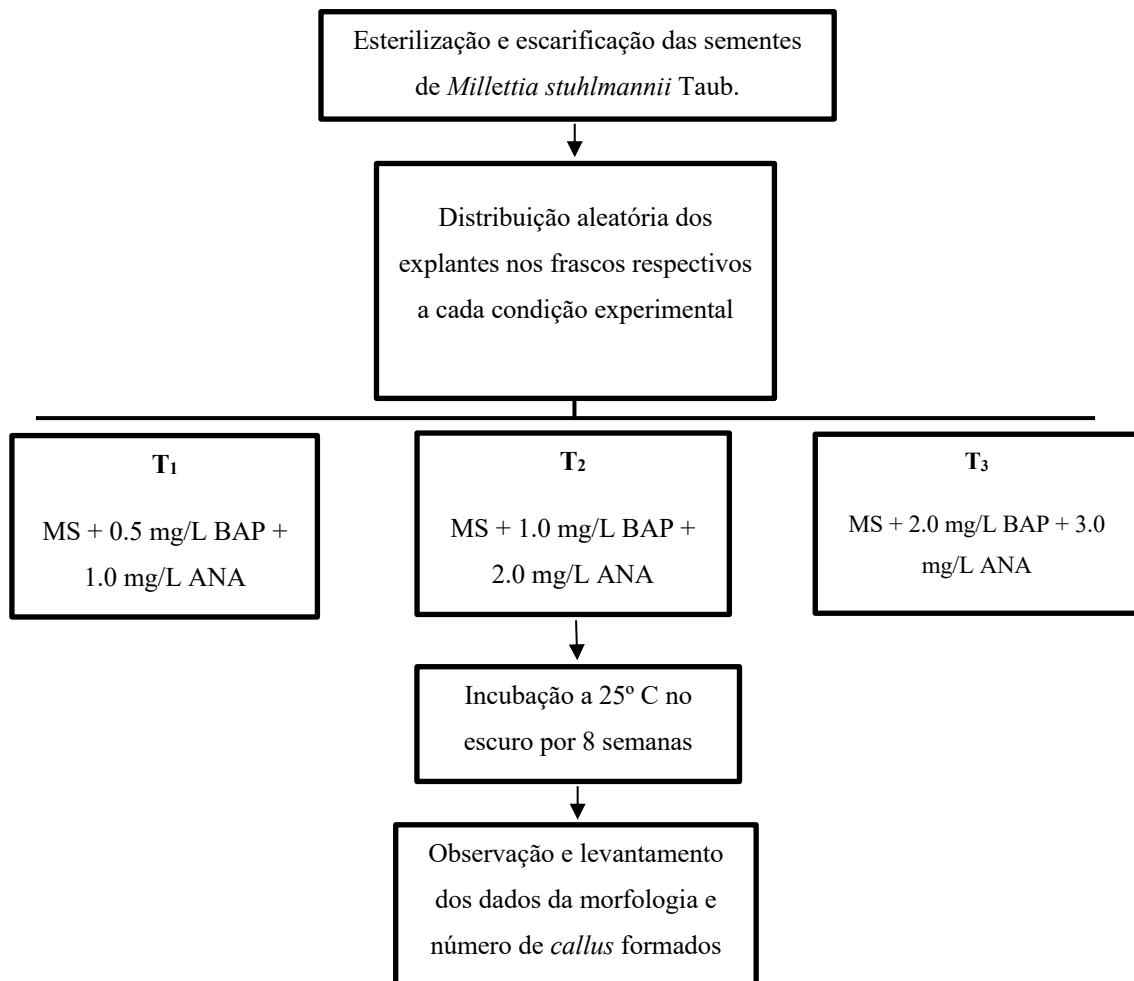


Figura 4: Fluxograma de actividades do estudo da indução de *callus* a partir de embriões zigóticos de *M. stuhlmannii*.

5.3.6. Análise de dados

Os dados foram organizados usando o Python, versão 3.12.4 (Python Software Foundation, Wilmington, DE, EUA), e a biblioteca de pandas, versão 2.2.2 (Pandas development team, Open Source).

A frequência de indução de *callus* formados foi registada, após 8 semanas, usando a seguinte fórmula:

$$FIC = \frac{NCF}{NTE} \times 100\%$$

Onde:

FIC – Frequência de indução de *callus*

NCF – Número de explantes com *callus* formados

NTE –Número total de explantes

Dada a natureza dos dados, foi realizado o Teste de Fisher com um nível de significância de 5% para verificar a existência de associações estatisticamente significativas. A análise do Teste de Fisher e a geração de gráficos foram realizadas usando o GraphPad Prism, versão 10.2.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. Resultados

6.1. Efeito das combinações de BAP e ANA na indução de *callus* em *Millettia stuhlmannii* Taub.

Foi verificado em cada tratamento o intumescimento de todos os explantes (embriões zigóticos de *M. stuhlmannii*, na primeira semana. A formação de *callus* teve início na terceira semana de observação, atingiu o pico na semana 5 e o seu esmorecimento começou na sexta semana, caracterizado pela mudança da cor dos *calli* de amarelo esbranquiçado para castanho, intensificando-se até a oitava semana (última semana de observação) (Figura 5).

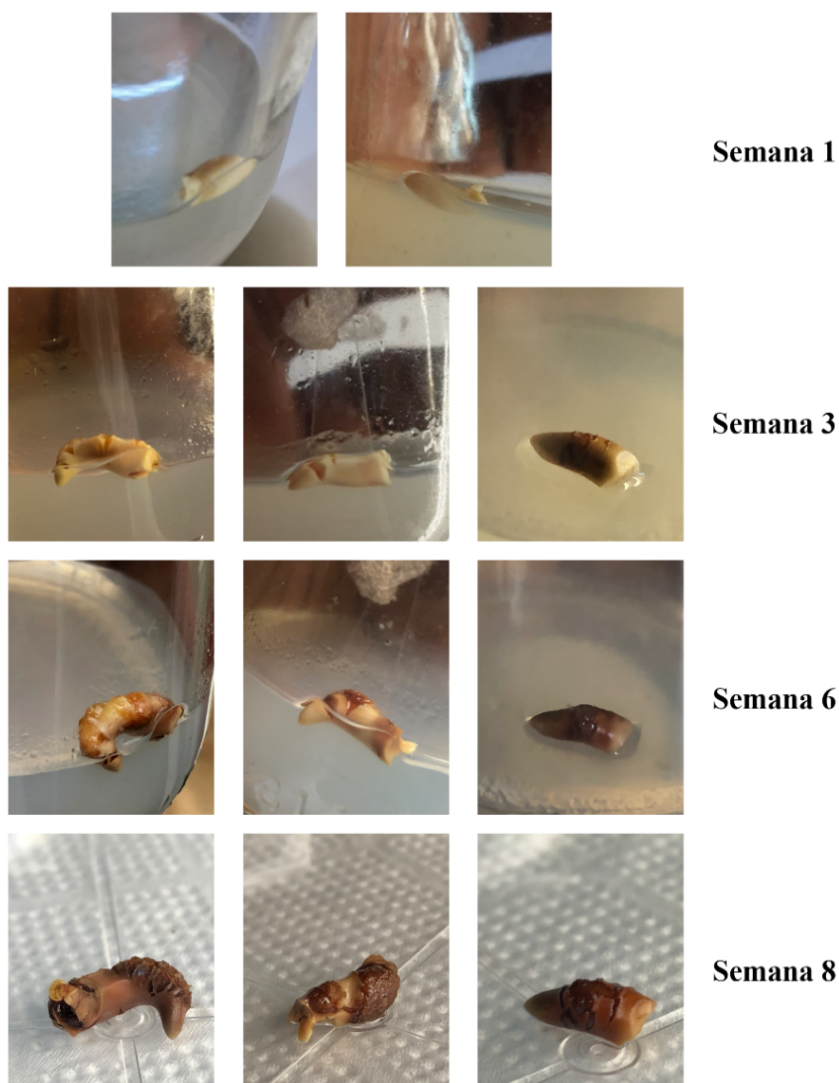


Figura 5: Formação e envelhecimento do *callus* a partir de embriões zigóticos de *Millettia stuhlmannii* Taub. ao longo de 8 semanas.

A combinação de BAP e ANA influenciou na indução de *callus* nos três tratamentos testados. O tratamento T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L) demonstrou a melhor resposta, com uma percentagem de indução de *callus* de 60%, três vezes maior do que a observada nos tratamentos T2 (BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L) e T3 (BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L) com uma percentagem de indução de *callus* de 20%. (Figura 6). No entanto, a relação entre a percentagem de indução de *callus* e os tratamentos não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$).

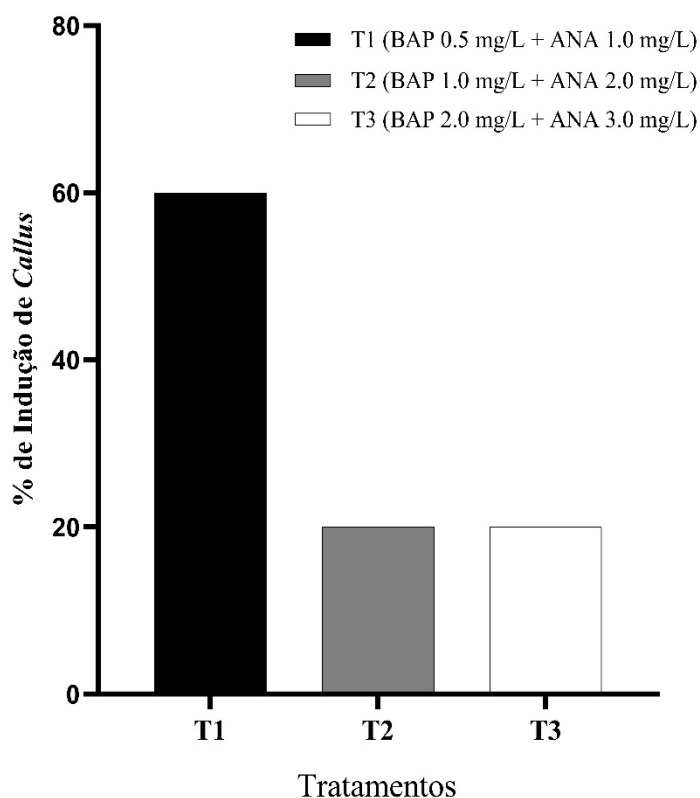


Figura 6: Percentagem de indução de *callus* em resposta a diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA designados T1, T2 e T3.

6.2. Efeito das combinações de BAP e ANA na morfologia do *callus* em *Millettia sthulmanni* Taub.

Todos os *calli* observados apresentaram inicialmente textura friável que se tornou compacta com o tempo, sendo uma característica comum para todos os tratamentos. Em relação a coloração, esta variou entre amarela e transparente, conforme ilustra a Figura 7, e a sua distribuição não foi linear. *Calli* de coloração amarela foram observados em explantes de todos tratamentos (T1, T2 e T3), enquanto que a coloração transparente foi

exclusiva para o tratamento T3 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L) em apenas um explante (Tabela 2).

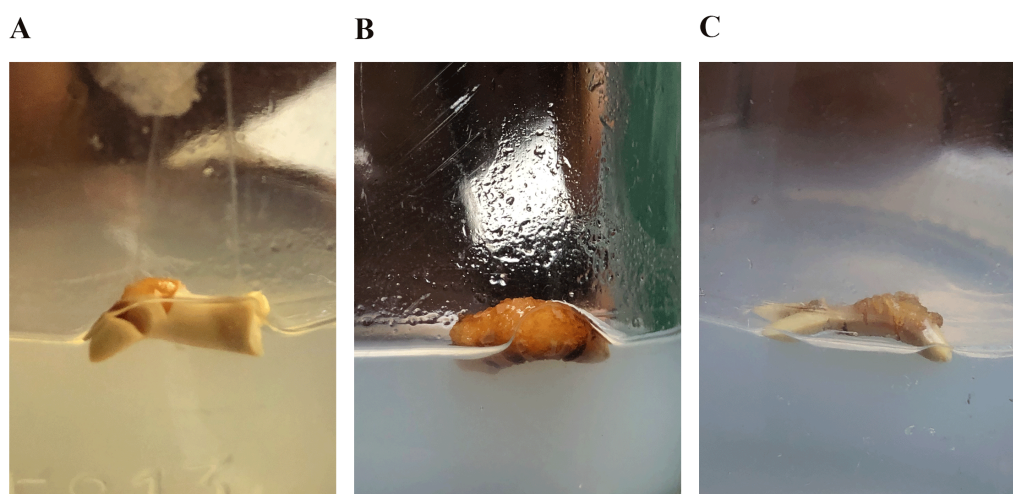


Figura 7: Características morfológicas iniciais dos *calli* formados. **A-B**, explante com *callus* friável de coloração amarela. **C**, explante com *callus* friável de coloração transparente.

Tabela 2: Características iniciais dos *calli* formados em cada tratamento.

Tratamento	Reguladores de crescimento ^a		Cor do <i>callus</i>	Textura
	BAP	ANA		
T ₁	0.5	1.0	Amarelo	Compacto
T ₂	1.0	2.0	Amarelo	Compacto
T ₃	2.0	3.0	Amarelo, Transparente	Compacto, Friável

Nota. ANA = Ácido naftaleno acético; BAP = 6-benzilaminopurina.

^a Unidade de medida em miligramas por litro (mg/L).

Foi observado que alguns explantes com *callus* amarelos também apresentavam estruturas que sugerem embriões somáticos, como demonstrado na Figura 8B e alguns explantes possuíam apenas embriões somáticos, (Figura 8A). Ao analisar a distribuição dos explantes em relação à formação de *callus* e à presença de embriões somáticos, foi verificado no tratamento T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L a maior a percentagem de embriões somáticos em explantes com *callus* com 60%. O tratamento T2 (BAP 1.0 mg/L

+ ANA 2.0 mg/L) foi o que apresentou a maior percentagem (30%) de embriões somáticos nos explantes que não formaram *callus*, (Figura 9). Esses resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

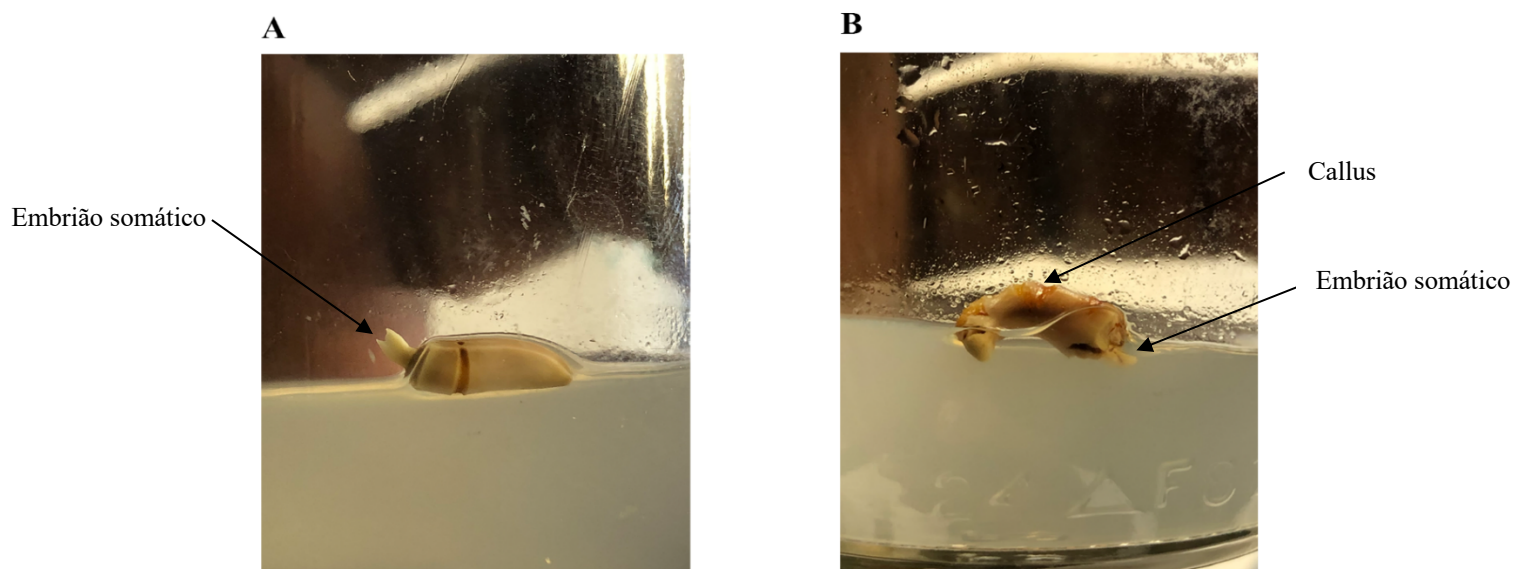


Figura 8: Formação de *callus* e presença de embriões somáticos. **A**, explante sem *callus* exibindo a presença de embrião somático. **B**, explante com *callus* exibindo a presença de embrião somático.

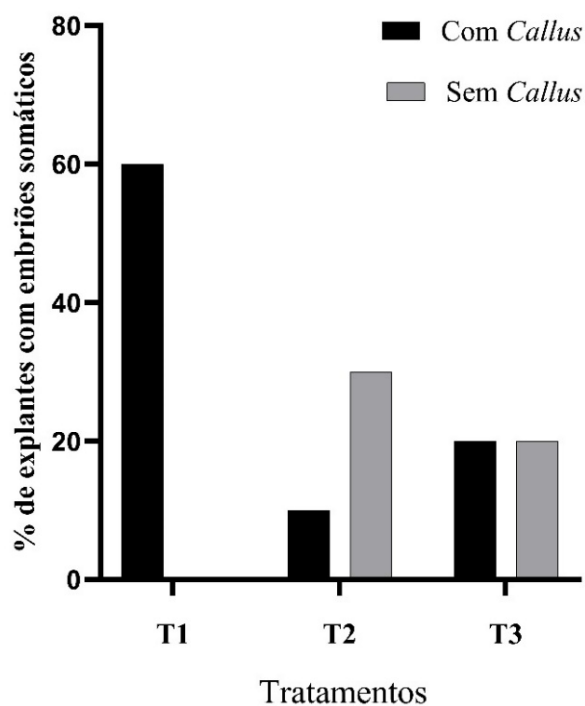


Figura 9: Percentagem de explantes com e sem *callus* que desenvolveram embriões somáticos em cada tratamento. Sendo T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L), T2 (BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L) e T3 (BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L).

Registrou-se a presença de contaminação no tratamento T2 (BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L), afectando apenas um dos explantes. A contaminação manifestou-se como uma camada aquosa de coloração esbranquiçada que cobriu todo o explante e começou a ser visível uma semana depois da inoculação. Entretanto, não foi observada a indução de *callus* nem de embriões somáticos, como se pode observar na Figura 10.



Figura 10: Contaminação do meio de cultura. Camada esbranquiçada em volta do explante, indicando presença de contaminação.

7. Discussão

7.1. Efeito das combinações de BAP e ANA na indução do *callus*

No presente estudo, foi observado, logo após a primeira semana, o intumescimento dos explantes, onde se observava uma dilatação do embrião zigótico. Esses resultados assemelham-se a outros trabalhos com embriões zigóticos (Granja *et al.*, 2018; Reyes-Díaz *et al.*, 2017), assim como no uso de outros explantes (Ajijah *et al.*, 2016; Bhusare *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2020), em que se verificou o aumento do tamanho do explante, nos primeiros dias após a inoculação no meio de cultura.

Essa dilatação sugere que exista uma resposta por parte do explante, resultando no início de uma proliferação celular, em virtude da presença dos reguladores de crescimento. A presença de auxinas e citoquininas no meio de cultura pode ter estimulado, numa primeira fase, o processo de divisão celular (Rademacher, 2015; Taiz e Zeiger, 2010), como já foi verificado em estudos anteriores em que tanto em explantes, cujos meios continham a presença exclusiva de auxina (Campos-Boza *et al.*, 2022) ou de citoquinina (Wang *et al.*, 2023), assim como o uso da combinação das duas (Bhusare *et al.*, 2020; Granja *et al.*, 2018).

A formação de *callus* foi visível em todos tratamentos e teve início na terceira semana de observação. Esses resultados demonstram que as combinações dos reguladores de crescimento BAP e ANA foram eficazes no processo de calogénese mediante o uso de embriões zigóticos como explante, aspecto que se encontra em consonância com os resultados de Wu *et al.* (2020) em *Ormosia henryi* Prain (Fabaceae), Gao *et al.* (2020) em *Pinus koraiensis* Sieb. Et Zucc (Pinaceae), ambas espécies madeireiras, e Ren *et al.* (2020) em *Paeonia ostii* ‘Fengdan’ (Paeoniaceae), uma espécie lenhosa.

Este facto ocorre porque a combinação de reguladores de crescimento estimula mudanças ao nível da expressão génica que culminam na indução de *callus* (Anzola *et al.*, 2010; Asghar *et al.*, 2023), sugerindo que o embrião zigótico de *M. stuhlmannii* também responde a esses mecanismos nas combinações de BAP e ANA utilizadas na experiência. A maior percentagem de indução de *callus* observada foi de 60% no tratamento T1, maior que os outros dois tratamentos (20%). Esse resultado é similar ao observado por Wu *et al.* (2020), que notou uma redução não significativa na indução de *callus* conforme a concentração de BAP e ANA aumentava. Essa nulidade na diferença entre os tratamentos pode ser justificada pelo facto de que as combinações não diferiram o suficiente para induzir respostas estatisticamente diferentes, ou ainda, pela possibilidade de que a

viabilidade de alguns explantes tenha sido comprometida durante o processo de isolamento (Wu *et al.*, 1992).

No entanto, Gao *et al.* (2020) verificaram melhores resultados com o aumento da concentração de BAP e ANA. Isso pode ser atribuído ao facto de que, ao contrário do presente estudo, eles utilizaram embriões zigóticos em estágio imaturo como explantes. Pois, quando se trata de embriões zigóticos, o estágio de desenvolvimento dita uma resposta diferente quando expostos aos mesmos reguladores de crescimento em cultura de tecidos (Das *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2021).

Os explantes inoculados em todos os tratamentos começaram a mudar de coloração para castanho a partir da quinta semana, com a mudança se prolongando até o último dia de observação. Esses resultados indicam o início do esmorecimento dos *callus*. Outros estudos, à semelhança deste, também reportaram o esmorecimento de *callus* por volta do mesmo período (Jayaraman *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2017).

O acastanhamento é comum em cultura de tecidos e ocorre após um certo tempo, levando a morte do explante (Duan *et al.*, 2022; Gumulak-Wołoszyn *et al.*, 2024). Esse processo ocorre devido a oxidação por conta da acumulação de compostos fenólicos no *callus* (Hesami *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2023) e o período de início do acastanhamento do *callus* pode indicar o momento ideal para que se realize a troca de meio, uma vez que a sua troca resulta numa redução do fenómeno (Duan *et al.*, 2022).

7.2. Efeito das Combinações de BAP e ANA na morfologia do *callus*

As características morfológicas mostraram que os *callus* eram inicialmente friáveis, tornando-se compactos ao longo das semanas, excepto o *callus* transparente. A coloração variou entre amarela e transparente, sendo que apenas os *calli* amarelos apresentaram embriões somáticos. Estas características morfológicas sugerem a alta capacidade de regeneração dos embriões zigóticos de *M. stuhlmannii* para a formação de *callus* embrionários, uma vez que *callus* compactos e com coloração amarelada são considerados com alta capacidade embriogénica (Islam *et al.*, 2014). Esses resultados corroboram com os resultados de Wu *et al.* (2020) que observou *calli* de coloração branca a amarelada de carácter compacto no seu trabalho com embriões zigóticos usando os reguladores BAP e ANA. Ferreira *et al.* (2022) observaram resultados similares usando embriões zigóticos como explantes, no entanto com reguladores de crescimento

diferentes Picloram e 2,4 D, demonstrando que a capacidade de indução de *calli* embrionários em embriões zigóticos não é exclusiva os reguladores BAP e ANA, e que outros reguladores de crescimento e outros factores acoplados a este podem estar a influenciar a desdiferenciação.

A observação singular de *callus* friável no tratamento T3 (BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L) reforça que os factores para além dos reguladores de crescimento e o explante podem influenciar no caminho que leva a desdiferenciação. A formação de *calli* friáveis já foi observada anteriormente quando se fez uso de embriões zigóticos como explante (Cai *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021). No entanto, esses embriões zigóticos possuíam uma idade fisiológica menor, sendo considerados imaturos, facto que sugere que provavelmente as sementes utilizadas no estudo, embora fossem todos embriões zigóticos maduros, possuísem idades fisiológicas diferentes devido ao tempo de colheita (George *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

A textura do *callus* é influenciada pela composição do meio de cultura, incluindo o tipo, a concentração de reguladores de crescimento (Pereira *et al.*, 2013) e factores ambientais como a exposição à luz (Ruíz-Rivas *et al.*, 2022). A textura compacta do *callus* resulta da aglomeração de células densamente compactadas (Bevitori *et al.*, 2013; Honda *et al.*, 1999; Wahyuni *et al.*, 2020). Por outro lado, a textura friável do *callus* ocorre devido a processos de remodelação celular, especialmente pelo afrouxamento da parede celular (Boamponsem e Leung, 2017; Ma *et al.*, 2015). Tanto os *calli* friáveis quanto os compactos produzem embriões somáticos, mas os *calli* compactos apresentam maior competência (Avila-Victor *et al.*, 2023). Isso sugere que a textura e a cor dos *calli* provenientes de embriões somáticos, no contexto desta espécie, podem servir como indicadores de *calli* embriogénicos de alta competência em experiências com embriões zigóticos.

Neste contexto, também se observou que alguns explantes possuíam embriões somáticos sem a prévia formação de *callus*, demonstrando a ocorrência de embriogénese somática directa. Em concordância com esses resultados, Xu *et al.* (2020) e Singh e Chand (2003) também reportaram a formação de embriões somáticos directamente do explante, ao usarem embriões zigóticos.

O processo de indução de embriões somáticos pela via directa ou indirecta, observada no estudo, pode ser explicado pela idade do explante, pois a colheita das sementes para o estudo não foi realizada no mesmo período. Facto que corrobora com os estudos de Gaj

(2001) e Das *et al.* (1997) que observaram que embriões zigóticos mais novos produziam embriões somáticos de maneira indirecta e os mais velhos de maneira directa.

Em concordância com esses resultados, Hu *et al.* (2017) demonstrou que o estágio de desenvolvimento de embriões zigóticos imaturos também influencia na resposta a indução, com maior potencial de produção de *calli* embrionários em estágios mais jovens. Gao *et al.* (2020) ao trabalhar com explantes no estágio pró-embrião, observou maior formação de *calli* nos estágios de pró-embrião em comparação com os estágios posteriores. Isso evidencia que, ao usar embriões zigóticos, o estágio de desenvolvimento e o período de formação do embrião influenciam na capacidade de produzir *calli* embrionários.

7.3. Efeito da presença de contaminação

A presença de contaminação foi identificada num dos explantes, caracterizada por uma camada esbranquiçada, após uma semana de observação. A presença de contaminação pode ser justificada pelo contacto dos cotilédones com os embriões, uma vez que os cotilédones são uma fonte comum de contaminação em cultura de tecidos (Sujatha *et al.*, 2008). Não obstante, em plantas lenhosas, as contaminações também podem ser endógenas, dificultando sua eliminação por esterilização de superfície (Grippin *et al.*, 2018).

Embora a esterilização reduza significativamente o nível de contaminação nos explantes (Çetin *et al.*, 2015), o uso de hipoclorito de sódio no processo de esterilização da superfície da semente nem sempre elimina totalmente os microrganismos (Aftab e Preece, 2007; Chirva *et al.*, 2023; Naue *et al.*, 2007).

Outro factor que pode explicar a persistência da contaminação é a ausência de antimicrobianos no meio de cultura. O uso desses compostos pode prevenir o desenvolvimento de contaminações (Çölgeçen *et al.*, 2011; Leão *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2019), e sua inclusão no meio deve ser considerada.

Neste explante não foi observada a morfogénese, e esta ausência de *callus* ou embrião no explante pode ser explicada pelo facto de que a competição entre o explante e os microrganismos contaminantes podem inibir o crescimento vegetal em cultura de tecidos (Darwesh *et al.*, 2024), por vezes causando até a morte do explante (Helaly *et al.*, 2014;

Leelavathy e Sankar, 2016). Portanto, é fundamental que estudos futuros explorem o uso de antimicrobianos nos meios de cultura.

8. Conclusão

A formação de *callus* iniciou na terceira semana e teve o seu pico na quinta semana após a inoculação.

A combinação da citocinina BAP e da auxina ANA culmina na indução de *callus* embriogênicos em todos os tratamentos.

O *callus* formado na sua maioria era morfolologicamente compacto com coloração meio amarelada.

A percentagem de indução de *callus* foi três vezes maior (60 %) no tratamento T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L) em comparação com o tratamento, T2 (BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L) e T3 (BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L) com uma percentagem de indução de *callus* de 20%.

A maior parte dos explantes que possuíam *callus* apresentou a maior percentagem de embriões somáticos (60%) no tratamento T1 (BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L). Enquanto que o tratamento T2 foi o que apresentou a maior percentagem (30%) de embriões somáticos nos explantes que não formaram *callus*.

9. Limitações

O estudo teve a seguinte limitação:

- ❖ Controle do período de colheita das sementes que serviram de fonte de explante, sendo obtidas em períodos diferentes, facto que comprometeu a padronização dos explantes usados.

10. Recomendações

O estudo propõe:

- ❖ O incremento da concentração de ANA em relação à de BAP, priorizando combinações onde a proporção de ANA seja superior à de BAP, de modo a avaliar o efeito de maiores concentrações deste regulador no processo de indução e desenvolvimento de *callus*;
- ❖ O monitoramento cuidadoso do período de colheita do explante, de modo a assegurar que todas as sementes sejam colhidas no mesmo período para que não haja diferenças na idade fisiológica do explante;
- ❖ A aplicação de métodos alternativos de esterilização superficial do explante.

11. Referências Bibliográficas

1. Abbas, M. S., El-Shabrawi, H. M., Soliman, A. Sh., e Selim, M. A. (2018). Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 191–201.
2. Aftab, F., e Preece, J. E. (2007). Forcing and *in vitro* establishment of softwood shoots from large stem segments of woody plants. In Z. Xu, J. Li, Y. Xue, e W. Yang (Eds.), *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond* (pp. 437–444). Springer Netherlands.
3. Ajijah, N., Hartati, Rr. S., Rubiyo, R., Sukma, D., e Sudarsono, S. (2016). Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 38(1).
4. Akinropo, M. S., Ayisire, B. E., e Ogbimi, E. R. (2020). *In vitro* callus and shoot regeneration in *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. - A fast timber yielding species. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(1), 74–89.
5. Anzola, J. M., Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., Müllner, A. E., e Luschnig, C. (2010). Putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10308–10313.
6. Asghar, S., Ghori, N., Hyat, F., Li, Y., e Chen, C. (2023). Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: A story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation*, 99(3), 413–428.
7. Avila-Victor, C. M., Arjona-Suárez, E. de J., Iracheta-Donjuan, L., Valdez-Carrasco, J. M., Gómez-Merino, F. C., e Robledo-Paz, A. (2023). Callus type, growth regulators, and phytagel on indirect somatic embryogenesis of coffee (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Plants*, 12(20), Article 20.
8. Azad, M. A. K., Yokota, S., Ohkubo, T., Andoh, Y., Yahara, S., e Yoshizawa, N. (2005). *In vitro* regeneration of the medicinal woody plant *Phellodendron amurense* Rupr. through excised leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(1), 43–50.

9. Bednarek, P. T., e Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(2), 245–257.
10. Bevitori, R., Popielarska-Konieczna, M., Dos Santos, E. M., Grossi-de-Sá, M. F., e Petrofeza, S. (2013). Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. *Protoplasma*.
11. Bhatia, S. (2015). Plant tissue culture. In Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., e Bera, T. (Eds.), *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences* (1, 31-107). Massachusetts: Elsevier Science.
12. Bhatla, S. C., e Lal, M. A. (2023). Plant growth regulators: An overview. In S. C. Bhatla e M. A. Lal (Eds.), *Plant Physiology, Development and Metabolism* (pp. 391–398). Springer Nature.
13. Bhusare, B. P., John, C. K., Bhatt, V. P., e Nikam, T. D. (2020). Induction of somatic embryogenesis in leaf and root explants of *Digitalis lanata* Ehrh.: Direct and indirect method. *South African Journal of Botany*, 130, 356–365.
14. Bidabadi, S. S., e Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, 9(6), Article 6.
15. Boamponsem, G. A., e Leung, D. W. M. (2017). Use of compact and friable callus cultures to study adaptive morphological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to iron supply. *Scientia Horticulturae*, 219, 161–172.
16. Bruschi, P., Mancini, M., Mattioli, E., Morganti, M., e Signorini, M. A. (2014). Traditional uses of plants in a rural community of Mozambique and possible links with Miombo degradation and harvesting sustainability. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 59.
17. Cai, X.-D., Wang, G.-Y., e Cao, W.-J. (2013). *In vitro* induction and proliferation of callus from immature cotyledons and embryos of *Juglans regia* cv. “Xiangling.” *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 378.
18. Campos-Boza, S., Vinas, M., Solórzano-Cascante, P., Holst, A., Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., e Jiménez, V. M. (2022). Somatic embryogenesis and plant regeneration from transverse thin cell layers of adult peach palm (*Bactris gasipaes*) lateral offshoots. *Frontiers in Plant Science*, 13, 995307.
19. Canhoto, J. M. (2010). *Biotechnologia vegetal: Da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra / Coimbra University Press.

20. Cano, V., Martínez, M. T., San José, M. C., Couselo, J. L., Varas, E., Bouza-Morcillo, L., Toribio, M., e Corredoira, E. (2020). Regeneration of transgenic plants by Agrobacterium-mediated transformation of *Quercus ilex* L. somatic embryos with the gene CsTL1. *New Forests*, 51(6), 1003–1021.
21. Çetin, B., Kurtuluş, B., e Bingöl, N. A. (2015). Effects of plant growth regulators on callus formation in different explant of *Calendula officinalis* L. *Journal of Applied Biological Sciences*, 9(3), Article 3.
22. Chakraborty, T., Chaitanya, K. V., Lambardi, M., e Akhtar, N. (2022). *In vitro* morphogenetic responses from cotyledonary explants of immature zygotic embryos of *Pterocarpus santalinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(3), 669–681.
23. Chandrasekhar, T., Hussain, T. M., e Jayanand, B. (2005). *In vitro* micropropagation of *Boswellia ovalifoliolata*. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 60(5–6), 505–507.
24. Chang, W.-Y., Wang, S., Gaston, C., Cool, J., An, H., e Thomas, B. R. (2019). Economic evaluations of tree improvement for planted forests: A systematic review. *BioProducts Business*, 1–14.
25. Chib, S., Thangaraj, A., Kaul, S., Dhar, M. K., e Kaul, T. (2020). Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Methods*, 16(1), 47.
26. Chirva, O. V., Ignatenko, R. V., e Ershova, M. A. (2023). *Pinus sylvestris* L. mature seeds megagametophytes cultured *in vitro*. Influence of the genotype and the growth regulators content in nutrient medium on the initiation of callus formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 152(2), 299–308.
27. Çölgeçen, H., Çalışkan, U., e Toker, G. (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 513–520.
28. Compton, M. (2012). Use of statistics in plant biotechnology. In Loyola-Vargas, V. M., e Ochoa-Alejo, N. (Eds.), *Plant cell culture protocols: Methods in molecular biology* (877, 109-127). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
29. Corredoira, E., San-José, M. C., e Vieitez, A. M. (2012). Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. *Trees*, 26(3), 881–891.

30. Coskun, Y., Duran, R. E., e Kilic, S. (2019). Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 89–95.
31. Costa, A. de O., Silva, L. A. S., Duarte, I. M., Sampaio, V. F., Machado, M., Silva, G. Z. da, Silva, M. L. da, e Rocha, D. I. (2019). Kinetin and 6-benzyladenine induce different morphogenetic responses in cotyledonary segments of royal poinciana. *Ornamental Horticulture*, 25, 270–275
32. Cuvilas, C., Lhate, I., Jirjis, R., e Terziev, N. (2014). The Characterization of Wood Species from Mozambique as a Fuel. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 36(8), 851–857.
33. Dalila, Z. D., Jaafar, H., e Manaf, A. A. (2012). Effects of 2,4-D and Kinetin on Callus Induction of *Barringtonia racemosa* Leaf and Endosperm Explants in Different Types of Basal Media. *Asian Journal of Plant Sciences*, 12(1), 21–27.
34. Dalton, S. J. (2020). A reformulation of Murashige and Skoog medium (WPBS medium) improves embryogenesis, morphogenesis and transformation efficiency in temperate and tropical grasses and cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), 257–273.
35. Darwesh, O., Zaied, N., e Hassan, S. (2024). Control of microbial contamination during the micropropagation process of some fruit trees. *Egyptian Journal of Agronomy*.
36. Das, P., Samantaray, S., Roberts, A. V., e Rout, G. R. (1997). *In vitro* somatic embryogenesis of *Dalbergia sissoo* Roxb. - A multipurpose timber-yielding tree.
37. Davey, M. (2017). Organogenesis. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (pp. 448–454). Elsevier.
38. Duan, S., Xin, R., Guan, S., Li, X., Fei, R., Cheng, W., Pan, Q., e Sun, X. (2022). Optimization of callus induction and proliferation of *Paeonia lactiflora* Pall. and Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 996690.
39. Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59.
40. Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., e García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18.
41. FAO (2020). *Global Forest Resources Assessment 2020 – Key findings*. Rome.

42. FAO (2022). *FRA 2020 Remote Sensing Survey*. FAO Forestry Paper, No. 186. Rome.
43. Fern, K. (2024). Tropical plants database. Tropical. theferns.info. Acedido em: a 30 de Outubro de 2024. Em: <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Millettia+stuhlmannii>.
44. Ferreira, J. C. B., De Araújo Silva-Cardoso, I. M., De Oliveira Meira, R., e Scherwinski-Pereira, J. E. (2022). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3), 667–686.
45. Gaj, M. D. (2001). Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1), 39–46.
46. Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., e Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro Cellular e Developmental Biology – Plant*, 12(7), 473–478.
47. Gao, F., Peng, C., Wang, H., Tretyakova, I. N., Nosov, A. M., Shen, H., e Yang, L. (2020). Key Techniques for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Pinus koraiensis*. *Forests*, 11(9), 912.
48. George, E. F., Hall, M. A., e Klerk, G.-J. D. (2007). Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In E. F. George, M. A. Hall, e G.-J. D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 403–422). Springer Netherlands.
49. Ghorbanpour, M., e Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. *Carbon*, 94, 749–759.
50. Golle, D., Reiniger, L., Stefanel, C., Serrote, C., Rabaiolli, S., e Buuron da Silva, K. (2020). Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. *Ciência Florestal*, 30, 898–906.
51. Gomes, L. F., Longhi, P. J. H., Machado, L., da Cruz, I. B. M., Montano, M. A. E., Martins, M., Machado, S. A., Steffani, J. A., e Cadoná, F. C. (2021). Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) Presents Antitumoral Effect and Improves Chemotherapy Activity in Prostate Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(17), 2337–2350.
52. Grafi, G. (2004). How cells dedifferentiate: A lesson from plants. *Developmental Biology*, 268(1), 1–6.

53. Grafi, G., e Barak, S. (2015). Stress induces cell dedifferentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 378–384.
54. Granja, M. M. C., Motoike, S. Y., Andrade, A. P. S., Correa, T. R., Picoli, E. A. T., e Kuki, K. N. (2018). Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. *Industrial Crops and Products*, 117, 1–12.
55. Grippin, A., Nor Aini, A. S., Nor Akhrrudin, M., Hazandy, A. H., Sures Kumar, M., e Ismail, P. (2018). The prospect of micropropagating *Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz, a tropical peat swamp forest timber species through tissue culture technique—Review. *Journal of Forest Science*, 64(1), 1–8.
56. Gumulak-Wołoszyn, N., Sułkowska, M., e Nawrot-Chorabik, K. (2024). Obtaining callus and seedlings of – studies of their morphogenetic capacity and rooting of seedlings. *Folia Forestalia Polonica*, 66(2), 129–143.
57. Han, C., e Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *PROTEOMICS*, 15(10), 1671–1679.
58. Helaly, M. N., El-Metwally, M. A., El-Hoseiny, H., Abdelaziz, S., e El-Sheery, N. I. (2014). Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana.
59. Hernández-García, A., Ambriz-Parra, E., López-Albarrán, P., Cruz-de León, J., e Salgado-Garciglia, R. (2021). *In vitro* propagation from axillary buds of the endangered tree *Dalbergia congestiflora* Pittier (Fabaceae). *Plant Biotechnology*, 38(4), 409–414.
60. Hesami, M., Tohidfar, M., Alizadeh, M., e Daneshvar, M. H. (2020). Effects of sodium nitroprusside on callus browning of *Ficus religiosa*: An important medicinal plant. *Journal of Forestry Research*, 31(3), 789–796.
61. Hofiço, N. dos S. A. (2021). *Potencial de regeneração natural e crescimento de Millettia stuhlmannii Taub. Em floresta de miombo como subsídio para o manejo sustentável* Tese, Universidade Federal de Santa Maria.
62. Honda, H., Ito, T., Yamada, J., Hanai, T., Matsuoka, M., e Kobayashi, T. (1999). Selection of embryogenic sugarcane callus by image analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5), 700–702.
63. Hopkins, W. G., e Huner, N. P. A. (2008). *Introduction to Plant Physiology* (4th ed.). Wiley Textbooks.

64. Hou, J., Wu, Y., Shen, Y., Mao, Y., Liu, W., Zhao, W., Mu, Y., Li, M., Yang, M., e Wu, L. (2015). Plant regeneration through somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature zygotic embryos of *Sapium sebiferum* Roxb. *Scientia Horticulturae*, 197, 218–225.
65. Hu, R., Sun, Y., Wu, B., Duan, H., Zheng, H., Hu, D., Lin, H., Tong, Z., Xu, J., e Li, Y. (2017). Somatic Embryogenesis of Immature *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook Zygotic Embryos. *Scientific Reports*, 7(1), 56.
66. Huang, B., Xu, L., Li, K., Fu, Y., e Li, Z. (2017). Embryo induction and plant regeneration of *Callerya speciosa* (Fabaceae) through anther culture. *Australian Journal of Botany*, 65(1), 80–84.
67. Huang, H., Wei, Y., Zhai, Y., Ouyang, K., Chen, X., e Bai, L. (2020). High frequency regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from cotyledon and hypocotyl cultures in a multipurpose tropical tree (*Neolamarkia Cadamba*). *Scientific Reports*, 10(1), 4558.
68. Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., e Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In A. Leva (Ed.), Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. *InTech*.
69. Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., e Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34(1), 107–114.
70. Hyde, M. A., Wursten, B. T., Ballings, P., e Coates Palgrave, M. (2024). *Flora of Zimbabwe: Species information: Millettia stuhlmannii*. Acesso em a 30 de Outubro de 2024. Em: https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=130110.
71. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., e Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173.
72. Islam, M., Haque, E., Islam, A., e Sikdar, B. (2014). Establishment of an Efficient Protocol for *In vitro* Callus Induction and Regeneration System Using Mature Embryo in Elite Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Research in Plant Biology*.
73. Jayaraman, S., Daud, N. H., Halis, R., e Mohamed, R. (2014). Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. *Journal of Forestry Research*, 25(3), 535–540.

74. Jayusman, Hakim, L., e Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant *in vitro* propagation: A comprehensive review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1115(1), 012051.
75. Joaquim-Meque, E., Lousada, J., Liberato, M. L. R., e Fonseca, T. F. (2023). Forest in Mozambique: Actual Distribution of Tree Species and Potential Threats. *Land*, 12(8), Article 8.
76. Kaçar, Y. A., Biçen, B., Varol, I., Mendi, Y. Y., Serçe, S., e Cetiner, S. (2010). Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 9(1), 416–424.
77. Kentelky, E., Jucan, D., Cantor, M., e Szekely-Varga, Z. (2021). Efficacy of Different Concentrations of NAA on Selected Ornamental Woody Shrubs Cuttings. *Horticulturae*, 7(11), Article 11.
78. Kharel, P., Creech, M. R., Nguyen, C. D., Vendrame, W. A., Munoz, P. R., e Huo, H. (2022). Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on *in vitro* shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 58(6), 1057–1065.
79. Kok, T., Daniel, X., e Soegiono, S. (2017). Induction of Callus Cultures from the Leaves of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels in Woody Plant Medium with Variations of Growth Hormones. In T. Taufik, I. Prabasari, I. A. Rineksane, R. Yaya, R. Widowati, S. A. Putra Rosyidi, S. Riyadi, e P. Harsanto (Eds.), *ICoSI 2014* (pp. 61–66). Springer Singapore.
80. Kong, D.-M., e Shen, H.-L. (2014). Somatic embryogenesis in Manchurian ash: Performance of various explant stock trees, optimisation of the basal medium, and simplified plant growth regulator combinations. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(1), 86–92.
81. Kumar, V., e Chandra, S. (2014). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production of the endangered species *Swertia chirayita*. *Biologia*, 69(2), 186–192.
82. Kyte, L., Kleyn, J., Scoggins, H., e Bridgen, M. (2013). *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*. Timber Press.
83. Le Bris, M. (2017). *Hormones in Growth and Development*. In *Reference Module in Life Sciences* (p. B9780128096338050585). Elsevier.

84. Leão, J. R. A., Raposo, A., Silva, A. C. L. da, e Sampaio, P. de T. B. (2020). Control of contaminants in the *in vitro* establishment of *Guadua latifolia*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 50.
85. Lee, S. H., Kim, Y. J., Yang, H. R., e Kim, J. B. (2019). Effect of cefotaxime on reduction of contamination for callus tissues in calla “Gagsi.” *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, 5(1), 409–412.
86. Leelavathy, S., e Sankar, P. D. (2016). *Curbing the Menace of Contamination in Plant Tissue Culture*.
87. Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K., e Gabriel, M. (2013). Influence of Absciscic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. Forma monstruosa. *The Scientific World Journal*, (1), 513985.
88. Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., Zheng, F., Teixeira Da Silva, J. A., Xiong, Y., e Ma, G. (2020). Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. *Scientific Reports*, 10(1), 11343.
89. Ling, W. T., Liew, F. C., Lim, W. Y., Subramaniam, S., e Chew, B. L. (2018). Shoot Induction from Axillary Shoot Tip Explants of Fig (*Ficus carica*) cv. Japanese BTM 6. *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 165.
90. Liu, H., Sun, P., Tong, Y., Gao, X., Tang, Z., e Fan, G. (2024). Establishment of transient and stable gene transformation systems in medicinal woody plant *Acanthopanax senticosus*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 142.
91. Liu, Y., Wei, C., Wang, H., Ma, X., Shen, H., e Yang, L. (2021). Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. *Journal of Forestry Research*, 32(4), 1613–1625.
92. Long, Y., Yang, Y., Pan, G., e Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13.
93. Louppe, D. (2008). Plant Resources of Tropical Africa (PROTA). PROTA.
94. Loyola-Vargas, V. M., e Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In V. M. Loyola-Vargas e N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 3–13). Springer.
95. Ma, Q., Zhou, W., e Zhang, P. (2015). Transition from somatic embryo to friable embryogenic callus in cassava: Dynamic changes in cellular structure, physiological status, and gene expression profiles. *Frontiers in Plant Science*, 6.

96. Mabilana, H. (2019). Conversão de áreas florestais: Tendências e projecções para 2035. *Apoio à formulação da Agenda Estratégica 2018-2035 e Programa Nacional de Florestas*. Maputo, Moçambique.
97. Magalhães, T. (2014). Análise do sistema de exploração dos recursos florestais em Moçambique. *Justiça Ambiental*. Maputo, Moçambique.
98. Marisa, F., Hidayati, L., Sasongko, A. B., e Nuringtyas, T. R. (2021). Callus induction from cotyledon of *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(2), 427–433.
99. McCown, B. H. (2021). Chapter 8 - Woody shrubs and trees. In Park, S. (Ed.), *Plant tissue culture* (4, 101-10). London: Academic Press.
100. Meneses, A., Flores, D., Muñoz, M., Arrieta, G., e Espinoza, A. M. (2005). Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biología Tropical*, 53(3–4), 361–368.
101. MITADER. (2018a). *Inventário florestal nacional. Direção Nacional de Florestas (DINAF)*. Ministério da Terra, Ambiente e Desenvolvimento Rural. Maputo, Moçambique.
102. MITADER. (2018b). *Desflorestamento em Moçambique (2003 - 2016)*. Maputo, Moçambique.
103. Mohamed, G. M., Amer, A. M., Osman, N. H., Sedikc, M. Z., e Hussein, M. H. (2021). Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5738–5744.
104. Mtshali, H., Gabayi, M., e Mathalauga, M. (2023). *Millettia stuhlmannii* Taub. National assessment: Red List of South African Plants version. *Threatened Species Programme | SANBI Red List of South African Plants*. Acesso a 30 de Outubro de 2024.
105. Munoz-Concha, D. (2017). Clonal propagation, forest trees. In V. M. Loyola-Vargas e N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (pp. 433–436). Elsevier.
106. Murashige, T., e Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
107. Naue, C. R., Benitiz, L. B., de Medeiros, C. V., e Sampaio, R. (2007). *Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de Nicotiana tabacum L.*

108. Nic-Can, G. I., e Loyola-Vargas, V. M. (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis. In V. M. Loyola-Vargas e N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications* (pp. 171–182). Springer International Publishing.
109. Nordine, A., Tlemcani, C. R., e El Meskaoui, A. (2014). Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 50(1), 19–25.
110. Normanly, J., Slovin, J. P., e Cohen, J. D. (2010). Auxin biosynthesis and metabolism. In P. J. Davies (Ed.), *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* (pp. 36–62). Springer Netherlands.
111. Odorico, D., Nicosia, E., Datizua, C., Langa, C., Raiva, R., Souane, J., Nhalungo, S., Banze, A., Caetano, B., Nhauando, V., Ragú, H., Machunguene Jr., M., Caminho, J., Mutemba, L., Matusse, E., Osborne, J., Wursten, B., Burrows, J., Cianciullo, S., Malatesta L, e Attorre, F. (2022). An updated checklist of Mozambique's vascular plants. *PhytoKeys*, 189, 61–80.
112. Ozias-Akins, P. (1989). Plant regeneration from immature embryos of peanut. *Plant Cell Reports*, 8(4), 217–218.
113. Palanyandy, S. R., Gantait, S., e Sinniah, U. R. (2020). Effects of some gelling agents and their concentrations on conversion of oil palm polyembryoids into plantlets. *Journal of Genetic Engineering e Biotechnology*, 18(1), 5.
114. Palgrave, K. C., Drummond, R. B., e Coates, M. (2002). *Trees of Southern Africa*. Struik Publishers.
115. Park, S. (2021). *Plant tissue culture*. Elsevier.
116. Phillips, G.C., e Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55, 242–257
117. Pereira, R. P. W., Monteiro, M. B. de O., e Abreu, H. dos S. (2013). Callogenesis in stem explants of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) showing resilience in oxide calluses. *Floresta e Ambiente*, 20, 407–416.
118. Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845–872.
119. Rahman, M. M., Mahmood, M., Abdullah, N., Shaharuddin, N. A., e Parvin, W. (2017). Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration

- from zygotic embryo derived callus of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(1), 51–61.
120. Raj, P., Jakhar, M., Ahmad, S., Mtilimbanya, K., Chahar, S., e Jat, H. (2020). Effect of culture media on shoot proliferation and callus induction of bael (*Aegle marmelos* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 243–248.
 121. Raven, P. H., Evert, R. F., e Eichhorn, S. E. (2013). *Raven biology of plants*. W.H. Freeman Publishers.
 122. Ren, X., Liu, Y., e Jeong, B. R. (2020). Enhanced somatic embryo induction of a tree peony, *Paeonia ostii* 'Fengdan', by a combination of 6-benzylaminopurine (BA) and 1-naphthylacetic acid (NAA). *Plants*, 9(1), Article 1.
 123. Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., e Vázquez-García, L. M. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products*, 108, 81–85.
 124. Ruíz-Rivas, M., Martínez-Núñez, M., Vera-Hernández, P. F., Martínez-Romero, E., e Rosas-Cárdenas, F. D. F. (2022). Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo *in vitro* de plantas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 27, 11–21.
 125. Salisbury, F. B., e Ross, C. W. (1992). *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company.
 126. Salma, U., Kundu, S., Ali, Md. N., e Mandal, N. (2019). Somatic embryogenesis-mediated plant regeneration of *Eclipta alba* (L.) Hassk. and its conservation through synthetic seed technology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(6), 103.
 127. Samim, A. K., Shivakumar, B. S., e M, G. (2021). Effect of IBA, NAA and their combination on rooting and biochemical parameters of stem cuttings in Barbados cherry. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8(5), Article 5.
 128. Shahrour, W. G., Shatnawi, M. A., Shibli, R. A., Al-Alawi, M., Abubaker, S. M., Majdalawi, M., e Alkawaldeh, A. K. (2024). Callus induction, shoot regeneration, and conservation of *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera*). *Brazilian Journal of Biology*, 84, e284231.

129. Singh, A. K., e Chand, S. (2003). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. *Journal of Plant Physiology*, 160(4), 415–421.
130. Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., e Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 228–243.
131. Su, Y., Wei, M., Guo, Q., Huang, J., Zhao, K., e Huang, J. (2023). Investigating the relationships between callus browning in *Isatis indigotica* Fortune, total phenol content, and PPO and POD activities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(1), 175–182.
132. Subasinghe, S., Warakagoda, P. S., e Abeywickrama, W. H. T. (2016). *In vitro* shoot proliferation of rosewood (*Dalbergia latifolia*: Fabaceae): A potent high-quality timber species. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 18(2), 94.
133. Sudheer, W. N., Praveen, N., Al-Khayri, J. M., e Jain, S. M. (2022). Role of plant tissue culture medium components. In *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 51–83). Elsevier.
134. Sugiyama, M. (2015). Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research*, 128(3), 349–359.
135. Sujatha, K., Panda, B. M., e Hazra, S. (2008). De novo organogenesis and plant regeneration in *Pongamia pinnata*, an oil-producing tree legume. *Trees*, 22(5), 711–716.
136. Taiz, L., e Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sinauer Associates.
137. Thorpe, T. A. (2006). History of plant tissue culture. In V. M. Loyola-Vargas e F. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 9–32). Humana Press.
138. Upadhyay, R., Kashyap, S. P., Tiwari, K. N., Singh, K., e Singh, M. (2015). Micropropagation of *Phyllanthus fraternus* Webster (Euphorbiaceae) from field-derived shoot tip explant and assessment of its genetic fidelity. *Brazilian Journal of Botany*, 38(3), 517–525.
139. Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte-Aké, F., e De-la-Peña, C. (2014). *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(2), 187–201.

140. Van Eck, J., Keen, P., e Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. In S. Kumar, P. Barone, e M. Smith (Eds.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (pp. 225–234). Springer.
141. Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Suman Kalyan, S., e Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 55–60.
142. Vieira, E. L., De Souza, G. S., Dos Santos, A. R., e Silva, J. D. S. (2010). *Manual de Fisiologia Vegetal*. edufma.
143. Wahyuni, D. K., Huda, A., Faizah, S., Purnobasuki, H., e Wardoyo, B. P. E. (2020). Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.f. *Biotechnology Reports*, 27, e00473.
144. Wang, J., Li, J., Li, J., Li, J., Liu, S., Huang, L., e Gao, W. (2017). Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), 115–125.
145. Wang, T., Udayabhanu, J., Gu, X., Wu, R., Xin, S., Chen, Q., Zhang, Y., Yang, X., Peng, S., Chen, J., e Huang, T. (2023). Induction of axillary bud swelling of *Hevea brasiliensis* to regenerate plants through somatic embryogenesis and analysis of genetic stability. *Plants*, 12(9), 1803.
146. Whiteley, S. E., Bunn, E., Menon, A., Mancera, R. L., e Turner, S. R. (2016). Ex situ conservation of the endangered species *Androcalva perlaria* (Malvaceae) by micropropagation and cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 341–352.
147. Winkelmann, T. (2013). Recent advances in propagation of woody plants. *Acta Horticulturae*, 990, 375–381.
148. Wu, G.-Y., Wei, X.-L., Wang, X., e Wei, Y. (2020). Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(2), 229–240.
149. Wu, Y., Haberland, G., Zhou, C., e Koop, H.-U. (1992). Somatic embryogenesis, formation of morphogenetic callus and normal development in zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. *Protoplasma*, 169(3), 89–96.
150. Xu, C., e Hu, Y. (2020). The molecular regulation of cell pluripotency in plants. *aBIOTECH*, 1(3), 169–177.

151. Xu, W., Zhang, M., Wang, C., Lou, X., Han, X., Zhang, J., Zhang, Y., e Tong, Z. (2020). Somatic embryo induction and Agrobacterium-mediated transformation of embryonic callus tissue in *Phoebe bournei*, an endangered woody species in Lauraceae. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 572–587.
152. Yu, Y., Liu, D., Liu, C., Yan, Z., Yang, X., e Feng, G. (2021). *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via direct and indirect organogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 15(3), 279–288.
153. Zhang, L., Lü, S., Yang, B., e Parsons, E. P. (2019). An efficient callus-based *in vitro* regeneration protocol for *Warburgia Ugandensis* Sprague, an important medicinal plant in Africa. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 55(1), 3–8.
154. Zhang, S., Yan, S., An, P., Cao, Q., Wang, C., Wang, J., Zhang, H., e Zhang, L. (2021). Embryogenic callus induction from immature zygotic embryos and genetic transformation of *Larix kaempferi* 3x *Larix gmelinii*. *PLOS ONE*, 16(10), e0258654.
155. Zhou, Q., Dai, L., Cheng, S., He, J., Wang, D., Zhang, J., e Wang, Y. (2014). A circulatory system useful both for long-term somatic embryogenesis and genetic transformation in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 157–168.
156. Zhou, Y., Li, Q., Wang, Z., e Zhang, Y. (2023). High efficiency regeneration system from blueberry leaves and stems. *Life* (Basel, Switzerland), 13(1), 242.
157. Zhu, X., Li, X., Ding, W., Jin, S., e Wang, Y. (2018). Callus induction and plant regeneration from leaves of peony. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59(4), 575–582.

12. Anexos



Figura 11: Câmara de fluxo laminar.



Figura 12: Sala de crescimento.



Figura 13: Sala de preparação.



Figura 14: Sementes incubadas em placas de Petri forradas com papel de filtro humedecido com água destilada de modo a facilitar a retirada do tegumento.



Figura 15: Excisão do embrião zigótico (explante) dos cotilédones.

Tabela 3: Número de explantes com *callus* e sem *callus* em cada tratamento.

Característica Amostral	Número de Explantes	
	Com <i>Callus</i>	Sem <i>Callus</i>
Tratamento 1	6	4
Tratamento 2	2	8
Tratamento 3	2	8

Nota. Tratamento 1 - BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L; Tratamento 2 - BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L e; Tratamento 3 - BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L.

Tabela 4: Análise de dados relativos a frequência de indução de *callus*. Teste Exacto de Fisher feito no GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	0.1225
P value summary	ns
One- or two-sided	NA
Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
Data analyzed	
Number of rows	3
Number of columns	2

Tabela 5: Número de explantes com embriões somáticos com *callus* e sem *callus* em cada tratamento.

Característica Amostral	Número de Explantes com embriões somáticos	
	Com <i>Callus</i>	Sem <i>Callus</i>
Tratamento 1	6	0
Tratamento 2	1	3
Tratamento 3	2	2

Nota. Tratamento 1 - BAP 0.5 mg/L + ANA 1.0 mg/L; Tratamento 2 - BAP 1.0 mg/L + ANA 2.0 mg/L e; Tratamento 3 - BAP 2.0 mg/L + ANA 3.0 mg/L.

Tabela 6: Análise de dados relativos a presença e ausência de embriões somáticos em explantes com *callus* e sem *callus* por cada tratamento. Teste Exacto de Fischer feito no GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	0.0370
P value summary	ns
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Number of rows	3
Number of columns	2