

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOSSANIDADE E BIOTECNOLIGIA APLICADA**

**DISSERTAÇÃO**

**INDUÇÃO DE CALOS EM *TEPHROSIAVOGELII* HOOK F.: PRODUÇÃO DE ROTENÓIDES  
“IN VITRO” NA PRESENÇA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO**

**TATIANA VIDAL GUIMARÃES**

**2022**



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOSSANIDADE E BIOTECNOLIGIA APLICADA**

**INDUÇÃO DE CALOS EM *TEPHROSIA VOGELII* HOOK F.:  
PRODUÇÃO DE ROTENÓIDES “IN VITRO” NA PRESENÇA DE  
DIFERENTES COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO**

**TATIANA VIDAL GUIMARÃES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Ederson da Conceição Jesus**

*e Co-orientação da Professora*

**Ana Cristina Siewert Garofolo**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e biotecnologia aplicada, Área de Concentração Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ

Setembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico  
Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V963i Vidal Guimarães, Tatiana, 1979-  
INDUÇÃO DE CALOS EM TEPHROSIA VOGELII HOOK F.:  
PRODUÇÃO DE ROTENÓIDES "IN VITRO" NA PRESENÇA DE  
DIFERENTES COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO /  
Tatiana Vidal Guimarães. - Rio de Janeiro, 2022.  
57 f.

Orientador: Ederson da Conceição Jesus.  
Coorientadora: Ana Cristina Siewert Garofolo.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Fitossanidade e  
Biotecnologia Aplicada, 2022.

1. Cultura de Tecido Vegetal. 2. Metabolismo em  
Plantas. 3. Tephrosia vogelii como espécie produtora  
de rotenóides. 4. Produção de rotenóides em plantas do  
gênero Tephrosia. I. da Conceição Jesus, Ederson ,  
1979-, orient. II. Siewert Garofolo, Ana Cristina ,  
1967-, coorient. III Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Fitossanidade e Biotecnologia  
Aplicada. IV. Título.

É permitida cópia total ou parcial deste documento, desde que seja citada a fonte

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**INDUÇÃO DE CALOS EM TEPHROSIA VOGELII HOOK F.:**  
**PRODUÇÃO DE ROTENOIDES “IN VITRO” NA PRESENÇA DE**  
**DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO**

**TATIANA VIDAL GUIMARÃES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/09/2022

---

Ederson da Conceição Jesus. Ph.D. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Ana Cristina Siewert Garofolo. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Co-orientador)

---

Fábio Souto de Almeida Dr., Ph.D. UFRRJ  
(Membro Titular)

---

Marcia Soares Vidal. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Membro Titular)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a meus pais André e Alba, aos meus sogros Valmir e Diraci, ao meu marido Luciano e aos meus filhos Yan e Gabriel por todo amor, carinho, conselhos, ajuda, paciência e incentivos que recebi.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear com minha família a que nasci e a que formei sem eles na minha vida trilhar o caminho seria com certeza muito mais difícil.

Aos meus orientadores Ederson e Ana Cristina por serem sempre fonte de inspiração e aprendizado, muito obrigada por tornar o aprender algo tão fascinante.

Aos amigos que a vida me deu, que incentivaram e tiveram paciência com cada ausência.

Aos meus colegas de laboratório por sua parceria.

Aos meus colegas da Embrapa tão essenciais para conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, juntamente ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada – PPGFBA pela oportunidade de realização do

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

Tatiana Vida Guimarães, nasceu no Rio de Janeiro - RJ, em 24 de novembro de 1979, filha do Engenheiro Mecânico e Professor de Física André Luiz Pestana Vidal e da Artesã Alba Regina Santos Vidal, residentes no Rio de Janeiro - RJ. Em 1996 ingressou na Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro, atual Instituto Federal do Rio de Janeiro Campus Rio de Janeiro, onde cursou e concluiu no mesmo ano o curso Técnico em Biotecnologia. Cumpriu o estágio curricular no Laboratório de Virologia Comparada na Fundação Osvaldo Cruz em 2001 e neste mesmo ano foi contratada no Laboratório de Controle Antidoping na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em 2005 ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. No ano de 2008 passou no concurso para Embrapa Agrobiologia para o Cargo de Técnica em Biotecnologia. Onde começou desempenhando suas atividades no Laboratório de Biologia Molecular, posteriormente nas Casas de Vegetação e atualmente desempenha suas atividades no Laboratório de Sementes e Produtos Naturais.

## RESUMO

GUIMARÃES, Tatiana Vidal. **Indução de Calos em *Tephrosia vogelii* Hook F.: Produção de Rotenoides “in vitro” na Presença de Diferentes Reguladores de Crescimento** 2022. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

A aplicação de inseticidas sintéticos é a forma mais comum de controle de pragas de insetos em produções agrícolas. Uma alternativa aos inseticidas sintéticos são os inseticidas botânicos. Em meados de 1800, a rotenona era introduzida como inseticida botânico. Entre as 400 espécies descritas do gênero das tefrosias a *Tephrosia vogelii* é a mais amplamente estudada como inseticida botânico. Ela é um arbusto perene cultivado no oeste da África, muito utilizada para enriquecimento do solo por sua propriedade de fixação biológica de nitrogênio e como inseticida por agricultores de pequenas propriedades. Entre as classes de fitoconstituintes encontram-se flavonóides, rotenóides, esteróides, sesquiterpenos, alcalóides, saponinas, compostos fenólicos entre outros. O uso da cultura de tecidos para produção de metabólitos secundários tem sido uma prática muito utilizada para várias espécies de plantas. Portanto o objetivo geral do presente estudo é definir um protocolo padronizado para a indução de calos a partir de plântulas de *Tephrosia vogelii*. Sendo testado dois explantes: hipocótilo e cotilédone em ensaios de indução de calos em meio Murashige e Skoog, com diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento, utilizado como citocinina a 6-benzilaminopurina (BAP) e as auxinas ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4-D) e o ácido indol-3-acético (AIA). Entre os objetivos específicos buscou-se definir o melhor explante para indução de calos friáveis, definir o protocolo para indução de calos vegetais friáveis com base em combinações de auxinas e citocinina, estabelecer a curva de crescimento dos calos para as diferentes combinações de auxinas e citocinina e avaliar os teores de rotenoides nas massas de calos em estudo. Entre as combinações de explante e tratamentos testados o cotilédone apresentou melhores resultados e quatro tratamentos se destacaram na indução de calos friáveis foram o tratamento 2 (T2), 1,0 mg/L 2,4-D, o tratamento 3 (T3), 2,0 mg/L 2,4-D o tratamento 8 (T8), 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L 2,4-D e o tratamento 9 (T9), utilizando 0,25 mg/L BAP e 2,0 mg/L 2,4-D. Dentre eles, os tratamentos 2 e 9 apresentaram as melhores taxas de crescimento. Com as curvas de crescimento foi possível inferir que o melhor período para realização de subculturas é entre 21 a 26 dias. Foi determinada a presença de rotenóides nos cinco tratamentos testados. A relação entre a concentração de deguelina encontrada para os tratamentos, em ordem decrescente de tratamento foi 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP (14), 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T8), 1,0 mg/L de 2,4-D (T2), 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T9) e o que apresentou a concentração mais baixa foi 2,0 mg/L de 2,4-D (T3). Para a rotenona a relação entre as concentrações foram 1,0 mg/L de 2,4-D (T2), 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T9), 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP (14), 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T8) e a concentração mais baixa foi no tratamento 2,0 mg/L de 2,4-D (T3).

Palavras chaves: Cultura de tecidos, reguladores de crescimento, rotenóides, inseticida botânico.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Tatiana Vidal. **Callus Induction in *Tephrosia vogelii* HOOK F.: Rotenoids in Production “In Vitro” in the Presence of Different Growth Regulators** 2022. 55p. Dissertation (Master's in Plant Health and Applied Biotechnology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

The application of synthetic insecticides is the most common way of controlling insect pests in agricultural production. An alternative to synthetic insecticides are botanical insecticides. In the mid-1800s, rotenone was introduced as a botanical insecticide. Among the 400 described species of the tephrosia genus, *Tephrosia vogelii* is the most widely studied as a botanical insecticide. It is a perennial shrub grown in West Africa, widely used for soil enrichment for its biological nitrogen fixation property and as an insecticide by smallholder farmers. Among the classes of phytoconstituents are flavonoids, rotonoids, steroids, sesquiterpenes, alkaloids, saponins, phenolic compounds, among others. The use of tissue culture for the production of secondary metabolites has been a widely used practice for several plant species. Therefore, the general objective of the present study is to define a standardized protocol for callus induction from seedlings of *Tephrosia vogelii*. Two explants were tested: hypocotyl and cotyledon in callus induction assays in Murashige and Skoog medium, with different combinations and concentrations of growth regulators, used as cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) and 2, 4-dichlorophenoxy acetic auxins (2,4-D) and Indole-3-acetic acid (IAA). Among the specific objectives, we sought to define the best explant for induction of friable calluses, define the protocol for induction of friable plant calluses based on combinations of auxins and cytokinin, establish the callus growth curve for the different combinations of auxins and cytokinin. and to evaluate the contents of rotonoids in the callus masses under study. Among the combinations of explant and treatments tested, the cotyledon showed the best results and four treatments stood out in the induction of friable calluses were treatment 2, using 1.0 mg/L 2,4-D, treatment 3, using 2.0 mg /L 2,4-D treatment 8, 0.25 mg/L BAP and 1.0 mg/L 2,4-D and treatment 9, using 0.25 mg/L BAP and 2.0 mg/L 2,4-D. Among them, the two presented the best growth rates treatment 2 and treatment 9. With the growth curves it was possible to infer that the best period for performing subcultures is between 21 to 26 days. The presence of rotonoids was determined in the five treatments tested. The relationship between treatments and the concentration of analytes found was in descending order for deguelin was 1.0 mg/L ANA 0.25 mg/L BAP (14), 1.0 mg/L 2,4-D 0.25 mg/L BAP (T8), 1.0 mg/L 2,4-D (T2), 2.0 mg/L 2,4-D 0.25 mg/L BAP (T9) and the one that showed the concentration lowest was 2.0 mg/L 2,4-D (T3). For rotenone, the relationship between concentrations was 1.0 mg/L 2,4-D (T2), 2.0 mg/L 2,4-D 0.25 mg/L BAP (T9), 1.0 mg /L ANA 0.25 mg/L BAP (14), 1.0 mg/L 2,4-D 0.25 mg/L BAP (T8) and the lowest concentration was in the treatment 2.0 mg/L 2 ,4-D (T3).

Keywords: Tissue culture, growth regulators, rotonoids, *Tephrosia vogelii*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Cultura de Tecido Vegetal.....	3
2.2 Metabolismo em Plantas.....	6
2.3 <i>Tephrosia vogelii</i> como espécie produtora de rotenóides .....	10
2.4 Produção de rotenóides em plantas do gênero <i>Tephrosia</i> .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.2. Estabelecimento da curva de crescimento do calo a partir da combinação de reguladores de crescimento e explantes de <i>Tephrosia vogelii</i> previamente selecionados.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.2 Estabelecimento da curva de crescimento dos calos para as diferentes combinações de auxinas e citocininas.....	23
4.3 Avaliação dos teores de rotenona e deguelina nas massas de calos de em <i>Tephrosia vogelii</i> considerando diferentes tratamentos para indução de calos.....	33
5. CONCLUSÕES .....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

# 1. INTRODUÇÃO

A atual demanda por defensivos agrícolas menos impactantes para a saúde do agricultor e para o meio ambiente tem direcionado as pesquisas para a redução ou eliminação do uso de inseticidas sintéticos nas lavouras. A motivação direcionada para pesquisas de soluções alternativas para o controle de pragas, como inseticidas botânicos em geral sendo utilizada partes da planta na forma de macerado de folhas secas, extratos ou soluções com as substâncias químicas isoladas (ZHANG *et al.*, 2020).

Tefrócias são plantas da família Fabaceae de origem tropical ou subtropical, amplamente distribuídas pelos continentes e a atividade biológica dos fitoquímicos presentes em diferentes partes da planta tem sido extensivamente estudada (IRVINE *et al.*, 1959; CHEN *et al.*, 2014). São descritas na literatura entre 350 e 400 espécies incluídas no gênero, sendo que entre as classes de fitoconstituintes encontram-se flavonoides, rotenóides, esteróides, sesquiterpenos, alcalóides, saponinas, compostos fenólicos entre outros. Estes compostos são utilizados pela medicina tradicional na forma de extratos ou macerados graças as suas propriedades anti-inflamatória, antidiabética, anti-helmíntica e outras. Na agricultura seus princípios ativos são usados como piscicida, pesticida, repelente de insetos, durante o armazenamento de sementes e como adubo verde pela propriedade de fixação biológica de nitrogênio, sendo amplamente descritos na literatura (OGENDO *et al.*, 2003; TOUQEER *et al.*, 2013; SAMUEL *et al.*, 2019).

Plantas possuidoras de princípios ativos inseticidas têm ganho destaque visto o grande apelo ambiental para uma agricultura de base mais natural para controle de pragas, especialmente em sistemas orgânicos de produção (MENEZES, 2005). Destacam-se nos últimos anos o interesse pelo uso de produtos botânicos para o manejo de pragas (ISMAN, 2020), visto que o uso de plantas como inseticida possui vantagens por serem mais seguras, ou seja, biodegradáveis no ambiente e mais difíceis dos insetos adquirirem resistência. Um gênero que tem se destacado com o potencial produtor de princípios inseticidas é a tefrosia (CHEN, 2014).

A *Tephrosia vogelii* Hook f. é um arbusto perene cultivado no oeste da África, muito utilizada para enriquecimento do solo por sua propriedade de fixação biológica de nitrogênio e como inseticida por agricultores de pequenas propriedades (BELMAIN *et al.*, 2012; GONÇALVES, 2012). A propriedade inseticida encontrada na *Tephrosia vogelii* está relacionada a presença dos rotenóides rotenona, deguelina, tefrosina e rotenolona (KODAMA *et al.*, 1980; LAMBERT *et al.*, 1993), os quais são encontrados em sementes, caules, e raízes, chegando a representar 4,25% (m/m) da composição das folhas (IRVINE *et al.*, 1959).

Belmain *et al.* (2012) e Mkindi *et al.* (2019) identificaram variação de quimiotipos para uma mesma espécie de tefrócias e entre espécies diferentes do gênero devido ao intrínseco processo de regulação do metabolismo secundário. Conhecer a composição dos diferentes quimiotipos é importante para definir o seu uso e a sua aplicação correta. *T. vogelii*, para ser usada como inseticida precisa apresentar quimiotipo contendo rotenona e deguelina em maiores concentrações, visto serem estes os responsáveis pelo caráter inseticida. Entretanto é conhecida a grande influência das condições edafoclimáticas na composição centesimal dos metabólitos químicos secundários (STEVENSON, 2012). Diante disso, o uso de técnicas para além da produção agrícola para a obtenção desses metabólitos ganha cada vez mais espaço, uma vez que não há descritas na literatura correlações entre as características fenotípicas e a expressão de diferentes quimiotipos pela planta em campo.

Pesquisas com a finalidade de produção de substâncias naturais *in vitro* tem ganho destaque, quer por exigência da sociedade cada vez mais corretamente saudável, quer pela indústria farmacêutica ou mesmo como opção de defensivo agrícolas alternativos. para controle de pragas.

A técnica de cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta que tem sido muito utilizada, tanto para a produção de metabólitos secundários *in vitro* como para a micropropagação de plantas. Técnicas de clonagem, obtidas a partir de uma pequena parte de material vivo de plantas, permitem a obtenção de

células filhas totipotentes com características genéticas passíveis de geração de uma nova planta sob estímulos hormonais apropriados (ILLG, 1991).

A produção de metabólitos secundário, através de técnicas de cultura *in vitro* tem sido amplamente utilizada para diversas espécies de plantas, mediante indução de calos celulares e ou células em suspensão. O cultivo de calos vegetais tem sido uma opção para potencializar a produção destes metabólitos de interesse, porém a regulação destes processos dentro da planta tem mecanismos ainda pouco conhecidos (SARIN *et al.*, 2005).

Nesta pesquisa buscou-se verificar o efeito de diferentes reguladores hormonais na indução de calos de *Tephrosia vogelii* e na produção de rotenóides *in vitro*. Considerando o exposto, o objeto de estudo desta pesquisa foi o processo biotecnológico de indução de calos *in vitro* desta espécie de Tefrósia, tendo como fundamentação teórica os estudos desenvolvidos previamente por Lambert (1998). Neste contexto, esta pesquisa buscou responder ao seguinte questionamento: “É possível obter calos com produção de rotenona e deguelina a partir de combinações de auxinas e citocininas em explantes de cotilédone e hipocótilo de modo mais eficiente e eficaz?”

Em outras palavras a hipótese deste trabalho foi que o crescimento de calos vegetais de *Tephrosia vogelii* para a produção de rotenóides está associada à composição do meio de cultura em que os explantes são inoculados e ao tipo de explante a ser usado.

O presente estudo teve como objetivo geral, o estabelecimento de um protocolo de cultura *in vitro* a partir de plântulas de *Tephrosia vogelii*, com combinações de diferentes explantes e combinações fatoriais de auxinas e citocinina. Entre os objetivos específicos buscou-se:

- a) Definir o melhor explante para indução de calor vegetais friáveis;
- b) Definir o protocolo para indução de calos vegetais friáveis com base em combinações de auxinas e citocinina;
- c) Estabelecer a curva de crescimento dos calos para as diferentes combinações de auxinas e citocinina;
- d) Avaliar os teores de rotenóides nas massas de calos em estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura de Tecidos Vegetal

A técnica de cultura de tecido é uma ferramenta que permite a manipulação biológica de uma planta a partir de um fragmento de tecido vivo chamado de explante, o qual é cultivado em um meio nutritivo controlado e asséptico. Esta técnica se baseia na capacidade das células se multiplicarem indefinidamente e na totipotência das células vegetais, sendo que esta última a capacidade que a célula vegetal tem de se diferenciar em qualquer tipo de célula somática do organismo o que permite o explante regenerar plantas férteis. A cultura de tecidos permite avanços no estudo da morfogenética, criopreservação de germoplasma, produção de plantas sem vírus, reinserção de populações de plantas em processo de extinção, produção de metabólitos secundários em biorreatores, gerar clones geneticamente idênticos a planta de origem, estudar mutações, etc. (PAIVA, 2001; ILLG, 1991).

Para obter-se o explante são utilizados fragmentos que podem ser retirados de qualquer parte da planta, quer seja raiz, folhas, gemas, extremidade de caule, hipocótilo ou ainda cotilédones. É a partir do tipo de explante que se define o protocolo de desinfestação para obtenção de um material asséptico, bem como o meio de cultura quimicamente mais adequado para a obtenção dos calos. Calo é uma estrutura que ocorre nas plantas, normalmente gerada em resposta a uma injúria física ou química, e se origina através de uma proliferação desorganizada das células podendo conter ainda áreas de tecido organizado e apresentam tecido indiferenciado e células indiferenciadas (QUISEN, 2008).

Quando o protocolo para obtenção do explante ocorre a partir de plântulas, a desinfestação deve ser realizada a partir da semente germinada em condições assépticas. Quando a obtenção do explante ocorre a partir de fragmentos da planta coletada em campo, a desinfestação deve ser realizada no próprio explante com soluções desinfestantes com o objetivo de reduzir a presença de macroorganismos contaminantes.

O meio de cultura a ser utilizado deve fornecer as condições essenciais de nutrientes para o explante, com ou sem a adição de reguladores hormonais dependendo da finalidade. Os nutrientes fornecidos pelo meio deverão ser capazes de proporcionar a manutenção das funções celulares e favorecer o crescimento celular. Para ser considerado adequado, o meio de cultura deve conter água, nutrientes minerais e orgânicos, como por exemplo aminoácidos e aminas, reguladores hormonais, vitaminas, e eventualmente outras fontes de suplemento orgânicos e material de suporte (agente gelificante).

O meio Murashige e Skoog (1962) é um dos meios mais utilizados sendo derivado do meio White (1942). Contém uma maior concentração de sais, menor concentração de sódio e com a presença de nitrogênio na forma de amônio sendo muito eficiente quando utilizado em conjunto com o B5, que é um meio otimizado com sais inorgânicos, mistura de vitaminas e carboidratos (GAMBORG *et al.*, 1968). A composição de um meio para crescimento celular é importante visto que as relações entre a célula e as moléculas orgânicas presentes nele fornecem todo arcabouço para a “escolha” de quais rotas metabólicas que a célula deverá definir durante seu desenvolvimento.

Macronutrientes e micronutrientes a serem adicionados ao meio na forma de diferentes sais serão fundamentais para diversos processos que ocorrerão no desenvolvimento do material “in vitro”. Os macronutrientes, utilizados em maior quantidade pela planta como o nitrogênio, terão papel fundamental durante a síntese de proteínas, assim como o Potássio, participará da regulação de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas. Já o cálcio estará relacionado a divisão celular e manutenção da integridade da membrana. Os micronutrientes deverão ser adicionados ao meio em baixas concentrações, entre os quais o magnésio, como um dos componentes da clorofila e importante cofator enzimático, o zinco como cofator de enzimas e reações de oxirredução na planta, o molibdênio como cofator da enzima redutase do nitrato e o cobre, como componente da enzima responsável pelo transporte de elétrons, entre outros (PAIVA, 2001). Fontes de carbono como o inositol ou mio-inositol

deverão ser adicionados ao meio favorecendo o crescimento “in vitro” da massa celular (QUISEN, 2008).

Reguladores de crescimento são moléculas orgânicas que em baixas concentrações tem a capacidade de promover diferentes respostas na fisiologia da planta. Quando adicionados ao meio de cultura, poderão desencadear, desacelerar ou mesmo paralisar processos metabólicos gerando resposta fisiológica ou morfológica.

Reguladores de crescimento quando produzidos pela planta são chamados hormônio vegetais, sendo o termo reguladores de crescimento atribuídos às substâncias exógenas produzidas por outros organismos ou mesmo sintéticas. (DE MELO, 2002; FAGAN, 2015). Estes compostos podem ser divididos em esteroides e não esteroides sendo esta característica capaz de influenciar a via de sinalização química necessária para o gatilho dos processos bioquímicos da célula vegetal. A ação destes compostos tem sido estudada por décadas este conhecimento possibilitou o uso na agricultura por apresentar efeitos específicos como herbicidas, inibidores ou estimulantes. Os hormônios mais estudados e com maior aplicação na agricultura são as auxinas, giberelinas, citocininas, o etileno e o ácido abscísico.

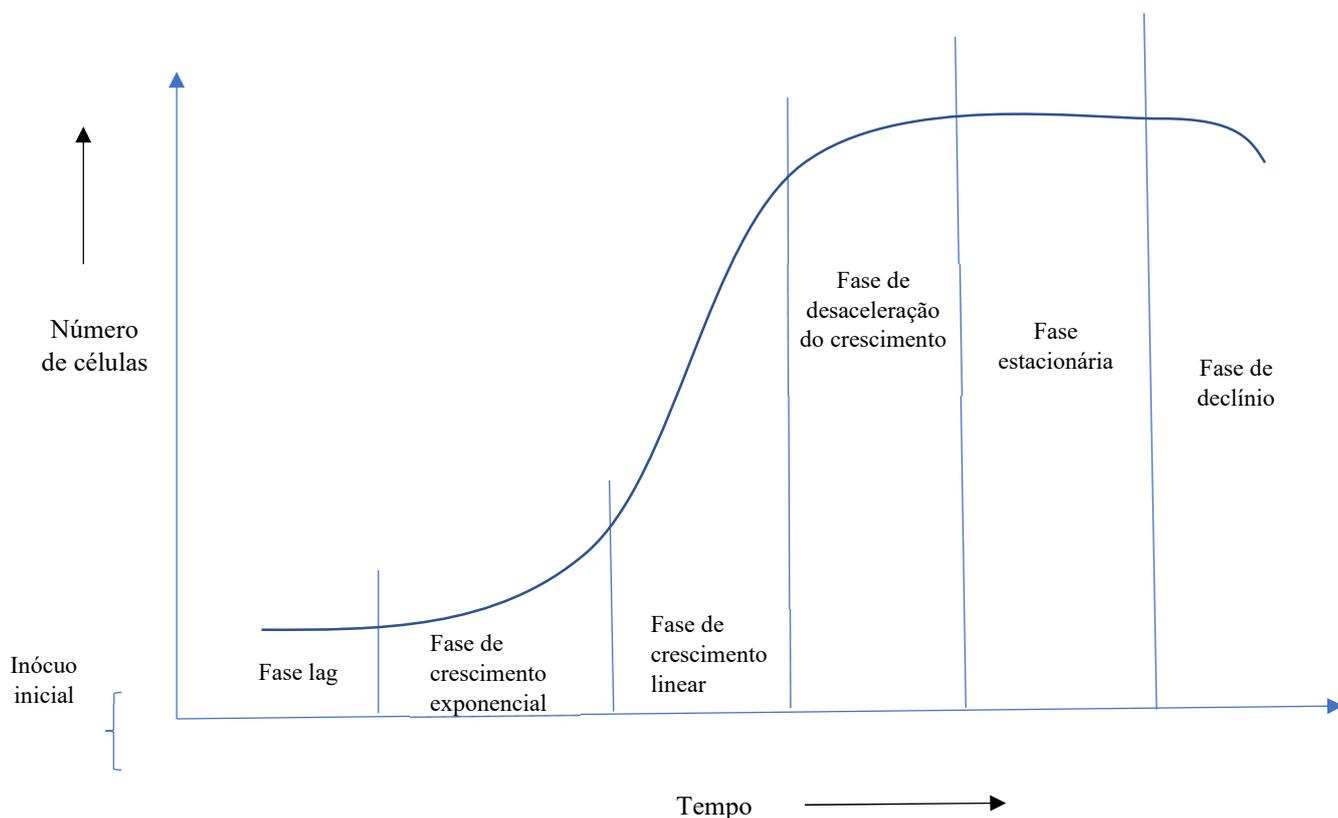
As condições físico-químicas e ambientais do meio de cultura devem ser ajustadas para proporcionar o melhor crescimento do explante, pois são fatores determinantes para o sucesso no estabelecimento do protocolo. O pH deve para meio de cultura deve variar entre 5,0 e 5,8, sendo pH mais próximo de 5,8 os mais indicados para meio sólido, visto que pH mais próximo de 5,0 podem levar a hidrólise de polissacarídeos e pH acima de 6,0 pode levar a precipitação de sais (PAIVA, 2001; QUISEN, 2008).

Entre as condições de incubação a serem observadas estão a luminosidade, temperatura, umidade relativa e trocas gasosas e devem ser acompanhadas pois estas exercem influência direta no metabolismo da explante e posteriormente do calo. No início da cultura e por um período mínimo na fase de repicagem deve-se manter a luminosidade baixa o que facilita por exemplo a desdiferenciação celular (TORRES, 1990). Dependendo da finalidade do estudo é necessário estabelecer um fotoperíodo adequando-se a incidência de luz a espécie em questão. A temperatura adequada de cultivo será aquela requerida para o crescimento da planta em seu ambiente natural.

Após inoculação do explante no meio, o recipiente poderá ser fechado com algodão, filme plástico, tampas de polipropileno desenvolvidas para cultura de tecidos, ou ainda outras opções. O tipo de sistema de vedação do recipiente permitirá ou não as trocas com o ambiente, podendo influenciar na umidade relativa do sistema de cultivo e as trocas gasosas que ocorrerão conforme desenvolvimento do explante/cultura de tecidos. Em um ambiente fechado poderá ocorrer acúmulo dos gases produzidos durante o desenvolvimento do cultivo *in vitro* causando acúmulo de gases, o que pode ocasionar efeitos indesejados no explante.

A indução de calos de planta originado a partir de um explante passa por três fases durante seu desenvolvimento. A primeira fase refere-se à indução da divisão, a segunda fase contempla um período de divisão celular ativa e desdiferenciação e a terceira fase refere-se a uma diminuição da divisão celular levando a um aumento da diferenciação celular (GEORGE, 1993; PAIVA, 2001).

Essas fases quando observadas em uma curva de crescimento a apresentam um padrão sigmoide que pode ser subdivididos seis fases como na Figura 1. A fase lag que ou fase de atraso, onde não ocorre divisão celular; a exponencial que é um período de divisão celular intensa. A fase linear onde o crescimento celular está ativo e é o ideal para repicagem. A fase de desaceleração em que ocorre redução da divisão celular; a fase estacionária, repicagem deve ser realizadas antes do fim desta fase. E a fase de declínio onde as células começam a morrer (PAIVA, 2001).



**Figura 01** - Curva de Crescimento teórica de uma cultura de tecidos.[Adaptado de George, (1993) e Paiva, (2001)].

Nas culturas de tecido estabelecidas a partir de plantas constatou-se em muitos casos a produção metabólitos secundários em quantidades insuficientes ou muito pequenas (SARIN, 2005). A biossíntese de metabólitos secundários em plantas depende de vários fatores sendo alguns internos do metabolismo, da própria espécie vegetal ou de fatores ambientais.

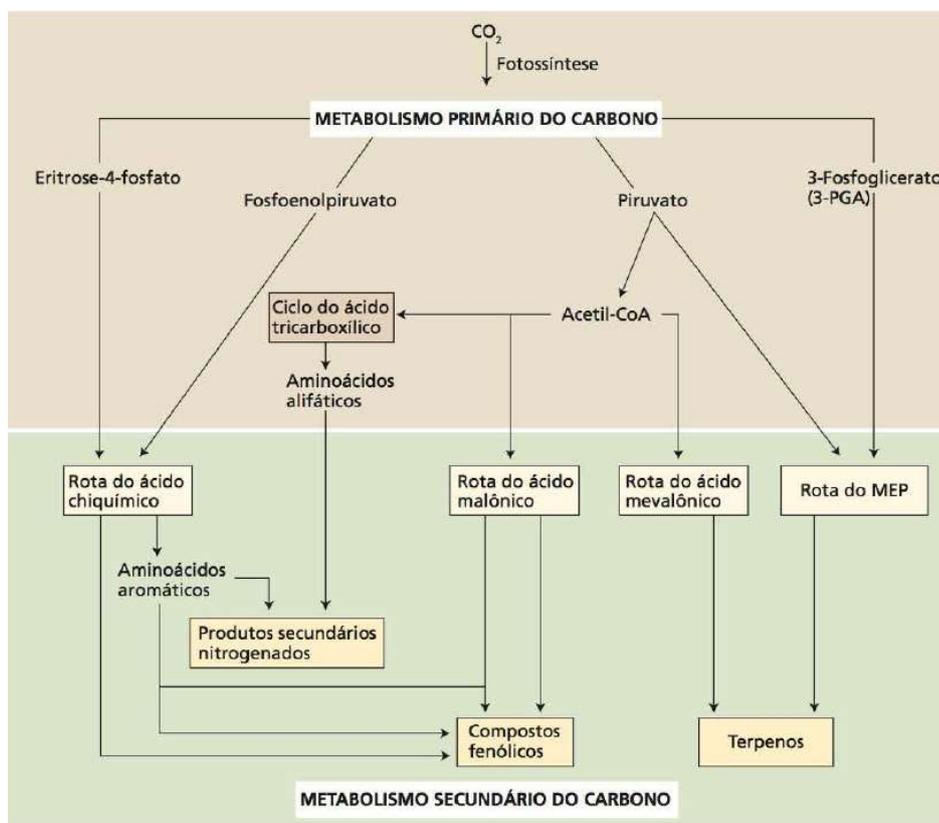
O acúmulo de metabólitos secundários pode ser estimulado por precursores e elicitores, sendo que os elicitores são fatores biológicos, químicos ou físicos que induzam a uma resposta enzimática contra um estresse. Dos reguladores hormonais, o ácido jasmônico e o metil jasmonato, foram propostos como importantes compostos de sinalização levando a hiperprodução de vários compostos secundários. A planta *Hypericum perforatum*, comumente conhecido como Erva de São João teve a produção de flavonoides estimulada pelo uso destes elicitores (WANG *et al.*, 2015). Em *Tephrosia vogelii* foi estudada a influência da ausência e presença de luz para produção de rotenóides, sendo constatado que na presença de luz ocorreu uma maior concentração destes metabólitos (LAMBERT *et al.*, 1993).

## 2.2 Metabolismo em Plantas

Para sua sobrevivência e reprodução as plantas apresentam um conjunto de reações químicas mediados por diferentes compostos atrelados ao metabolismo primário e secundário. O metabolismo em plantas é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário refere-se ao conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, tais como aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (PERES, 2019). Já o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas sendo os fatores bióticos e abióticos importantes para o disparo desta via metabólica.

Como exemplo de bióticos temos o papel dos produtos secundários como resposta a herbívora, competição entre plantas e atração de insetos polinizadores. Mudanças de temperatura, deficiências minerais e déficit hídrico entre outros fatores, exemplificam abióticos (TAIZ & ZAIGER, 2013). O metabolismo secundário é também importante para o desempenho agrícola ao agirem na defesa contra fungos, bactérias e herbívoros estando associado a biossíntese de moléculas envolvidas com mecanismos de proteção, defesa e regulação da planta.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados obtidos em três vias metabólicas: via do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto), chiquímico e malônico. A Figura 2 mostra, de forma simplificada, as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas interconexões com o metabolismo primário.



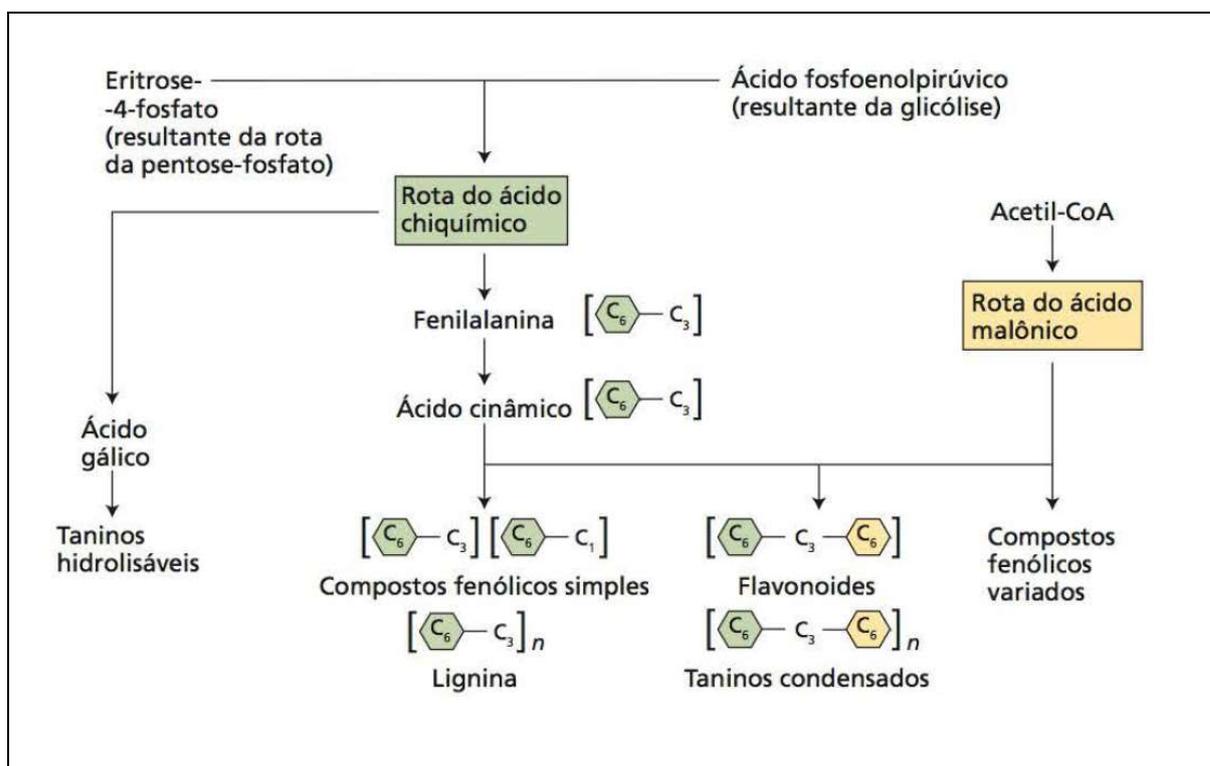
**Figura 2** - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário. Fonte: TAIZ & ZAIGER, 2013

Terpenos são substâncias com funções associadas ao crescimento, desenvolvimento e defesa vegetal, podendo ser considerados metabólitos primários ou secundários conforme o caso. Alguns hormônios vegetais são terpenoides ou originam-se de terpenos como por exemplo as giberelinas e os

brassinosteróides. Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários, sendo em geral insolúveis em água (TAIZ & ZAIGER, 2013). São sintetizados a partir de acetil-CoA ou de seus intermediários glicolíticos, sendo classificados pelo número de unidades C5 que possuem, visto que todos são derivados da união de unidades pentacarbonadas. Os terpenos são sintetizados a partir de metabólitos primários por, pelo menos, duas rotas diferentes: rota do ácido mevalônico e rota do metileritritol fosfato (MEP)

Uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui nitrogênio como parte de sua estrutura. Incluem-se nessa categoria alguns compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra a herbivoria, como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos, os quais são de considerável interesse, devido ao seu efeito tóxico para humanos e às suas propriedades medicinais. A maioria dos metabólitos secundários nitrogenados é sintetizada a partir de aminoácidos comuns, possuindo valores de pH básicos, sendo encontrados no citosol (pH 7,2) ou no vacúolo (pH 5 a 6). Os alcaloides são sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos, sobretudo lisina, tirosina ou triptofano, tendo como esqueleto carbônico um componente derivado da rota dos terpenos.

Compostos fenólicos são um grupo de compostos bastante presentes no nosso dia a dia, sendo que as plantas produzem uma grande diversidade de compostos. Quimicamente apresentam uma hidroxila funcional ligada a um anel aromático, podendo ser sintetizados por vias distintas: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico, a qual é menos significativa (Figura 3).

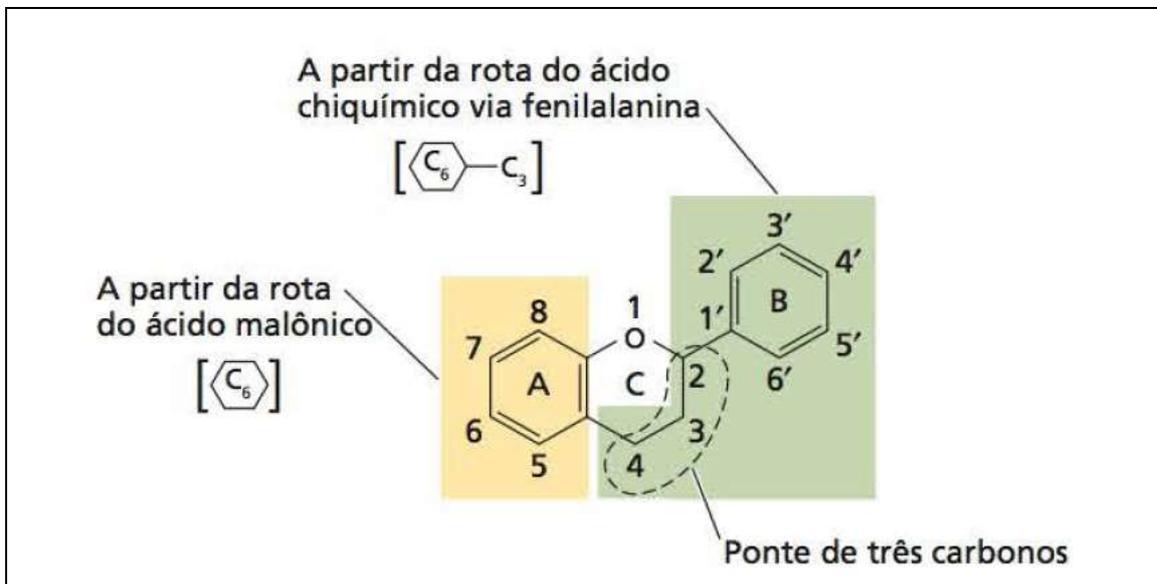


**Figura 3** - Rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico para síntese de compostos fenólicos. Fonte: TAIZ & ZAIGER, (2013).

Os vegetais são capazes de biossintetizar um elevado número de compostos fenólicos, alguns dos quais são indispensáveis para suas funções fisiológicas e outros para a defesa da planta. Além de sua importância na proteção das plantas contra fatores ambientais e bióticos adversos, os compostos fenólicos atuam, como no caso da lignina, no desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos (TAIZ & ZAIGER, 2013).

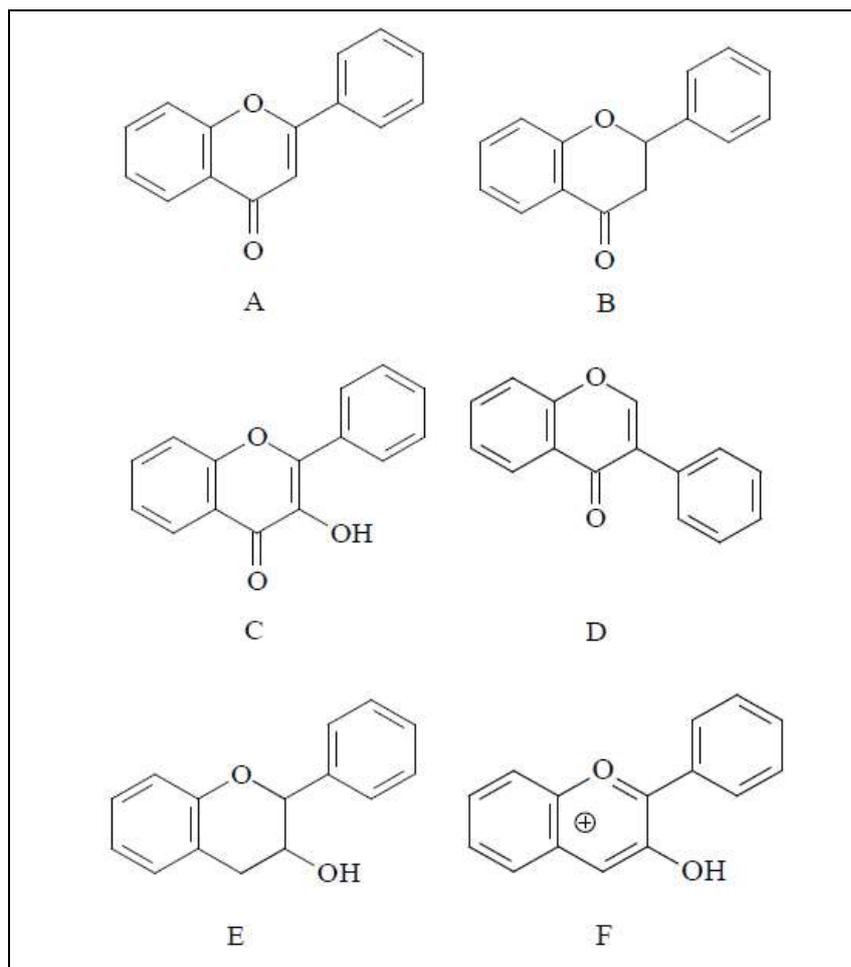
Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais, apresentando em sua estrutura 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos (Figura 4).

O esqueleto básico de carbono dos flavonoides pode ter vários substituintes originando diferentes compostos que desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa.



**Figura 4** - Esqueleto básico dos flavonoides. Fonte: TAIZ & ZAIGER, 2013.

Os flavonóides são a classe mais abundante em toda estrutura da planta, podendo ser encontrados tanto na forma de glicosídeos quanto de agliconas. Esse tipo de metabólito pode variar de quantidade na planta, dependendo da maturação e do crescimento em que o vegetal se encontra. Em plantas este metabólito secundário apresenta funções ligadas à proteção e herbívoras, organismos patógenos; atua também como auxiliar na orientação de insetos e polinização. A Figura 5 apresenta a estrutura química dos principais flavonóides.



**Figura 5** - Estrutura química dos principais flavonóides: (A) Flavona, (B) Flavanona, (C) Flavonóis, (D) Isoflavonas, (E) Flavanas e (F) Antocianinas. Fonte: (Oliveira, 2011).

Plantas com produção de princípios ativos são muito utilizadas no cotidiano, quer como medicinais e aromáticas quer como inseticidas e ou fungicidas. Entretanto, devido a heterogeneidade e a variabilidade genética e bioquímica e muitas vezes a dificuldade de multiplicação (MORAES *et al.*, 2012), a produção *in vitro* de metabolitos químicos secundários torna-se extremamente interessante. Desse modo, a cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* torna-se uma importante ferramenta para a produção em larga escala desses metabolitos secundários de interesse.

A cultura de tecidos tem sido utilizada para estudo dos princípios ativos produzidos pelo gênero das tefrosias e para obtenção de diferentes plantas para uso medicinal (LAMBERT, 1993; LAMBERT, 1998). A literatura apresenta vários estudos de cultura de tecidos *in vitro* entre os quais obtenção de propágulos de qualidade para *Tephrosia hookeriana* e *Tephrosia villosa* (THIRUPATY *et al.*, 2014; RANJITHA M *et al.*, 2018) e estudos da função antitumoral de extratos de calo de *Tephrosia tinctoria* e *Tephrosia purpurea* (MUJEEB *et al.*, 2012; RAJARAM *et al.*, 2013). Neste contexto é preciso considerar que a padronização de protocolo de micropropagação é útil para multiplicação em massa da planta selecionada e a conservação do germoplasma.

### 2.3 *Tephrosia vogelii* como espécie produtora de rotenóides

Tefrócias são plantas da família das fabáceas, de crescimento lento, com cerca de 400 espécies distribuídas nas regiões tropical e subtropical. Algumas espécies são amplamente estudadas e muito utilizadas por suas propriedades farmacológicas e medicinais, e ou por aplicações na agricultura ou piscicultura devido as propriedades piscicida e como repelente de insetos. Por serem leguminosas também têm seu uso difundido como adubo verde, favorecendo a fixação biológica de nitrogênio.

Os estudos fitoquímicos revelaram a presença de glucosídeos, rotenóides, isoflavonas, chalconas, flavonas, flavononas e flavonóides prenilados (CHEN *et al.*, 2014). Extratos de tefrócia revelaram diversas ações farmacológicas tais como antivirais, inseticidas, antiprotozoárias e antiplasmodiais e atividade citotóxica. (CHEN *et al.*, 2014; SAMUEL *et al.*, 2019; TOUQUEER *et al.*, 2013).

Considerando o gênero das tefrócias, 52 espécies são amplamente estudadas apresentando diferentes constituintes químicos, sendo que as mais comumente associadas com a atividade inseticida a *Tephrosia candida*; *Tephrosia elata*; *Tephrosia purpurea*; *Tephrosia villosa*; *Tephrosia virginiana*; e *Tephrosia vogelii* (CHEN *et al.*, 2014; ZAFAR *et al.*, 2002; ZANG *et al.*, 2020). Este gênero é amplamente distribuído nas regiões tropicais, subtropicais e áridas do mundo e tem importância por seu uso tradicional na agricultura e por possuir bioatividade por causa das suas fitoalexinas (TOUQUEER *et al.*, 2013). Das cerca de 400 espécies do gênero a mais intensamente estudada tem sido a *Tephrosia vogelii* (ZANG *et al.*, 2020).

A *Tephrosia vogelii* é um membro tropical da subfamília Papilionácea original da Angola, foi tradicionalmente cultivada no oeste da África. Ela é um arbusto de base ramificada, perene e possui entre 2 a 3 metros no primeiro ano, as folhas alternadas entre 20 a 25 centímetros são imparipinadas com cerca de dez pares de folíolos (Figura 6). As flores brancas, as vezes purpuras são agrupadas em terminais racemos, e possui vagem plana. Do gênero tefrócia, esta espécie é uma das mais estudadas por ter como produto do seu metabolismo secundário compostos como os rotenóides, flavonóides e esteroides (LAMBERT *et al.*, 1993). Sua distribuição no Brasil se dá no sudeste de São Paulo e Minas Gerais em regiões antrópicas, sendo utilizada na agricultura como adubo verde por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio e também uso do controle biológico de insetos (DO BRASIL, 2020). A deguelina também tem seu uso associado ao controle biológico de insetos (WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020).



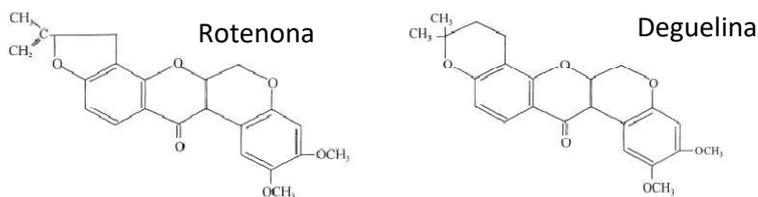
**Figura 6** - *Tephrosia vogelii*. Fonte: GONÇALVES JUNIOR (2012).

O uso de *T. vogelii* no manejo de pragas tem ocorrido através de uso de tecidos secos e extratos para proteção de grãos, extratos para o controle de pragas em campo ou ainda comercializada para o controle de pragas. As propriedades inseticidas da *T. vogelii* são associadas aos rotenóides: rotenona, tefrosina, deguelina, toxicarol, desidrodeguelina, eliptona, 12ahidroxirotenona, que foram relatados de várias partes da planta (STEVENSON *et al.*, 2012; KARIUK *et al.*, 2018).

Estudos como o de Stevenson (2012) e Mkindi (2019) comparando material de folhas de diferentes estados da África relataram a presença de diferentes quimiotipos para a *T. vogelii*, sendo que nos quimiotipos com propriedades inseticidas o rotenóide majoritário era a deguelina seguido da tefrosina e foi descrito quimiotipos que apresentaram a ausência de rotenóides ou ainda uma combinação dos dois quimiotipos citados. Estes estudos apontaram a importância de identificar qual quimiotipo está sendo utilizado para cada finalidade, uma vez que a eficácia do uso está diretamente relacionada com este conhecimento. Fatores que podem influenciar no perfil bioquímico do quimiotipo são condições de carboidrato, presença de luz e uso de elicitores (LAMBERT *et al.*, 1993; LAMBERT *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2015).

## **2.4 Produção de rotenóides em plantas do gênero *Tephrosia***

Rotenóides são substâncias que ocorrem naturalmente como produto do metabolismo secundário na raiz, galhos, folhas e sementes, de algumas espécies de leguminosas do gênero *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tefrosia* e *Amorpha* (IRVINE *et al.*, 1959; LAMBERT *et al.*, 1998). Os principais rotenóides presentes na *Tephrosia vogelii* com propriedades inseticidas são a rotenona a deguelina, a tefrosina e o toxicarol (CROMBIE, 1984; LAMBERT, *et al.*, 1993; KARIUK *et al.*, 2018). As folhas apresentam concentrações que podem variar de 0,65 a 4,25% de rotenóides (IRVINE *et al.*, 1959). A Figura 07 apresenta a estrutura química da rotenona e da deguelina que são da família dos isoflavonóides e os compostos isolados em maior concentração na *Tephrosia vogelii* (LAMBERT, *et al.*, 1993).



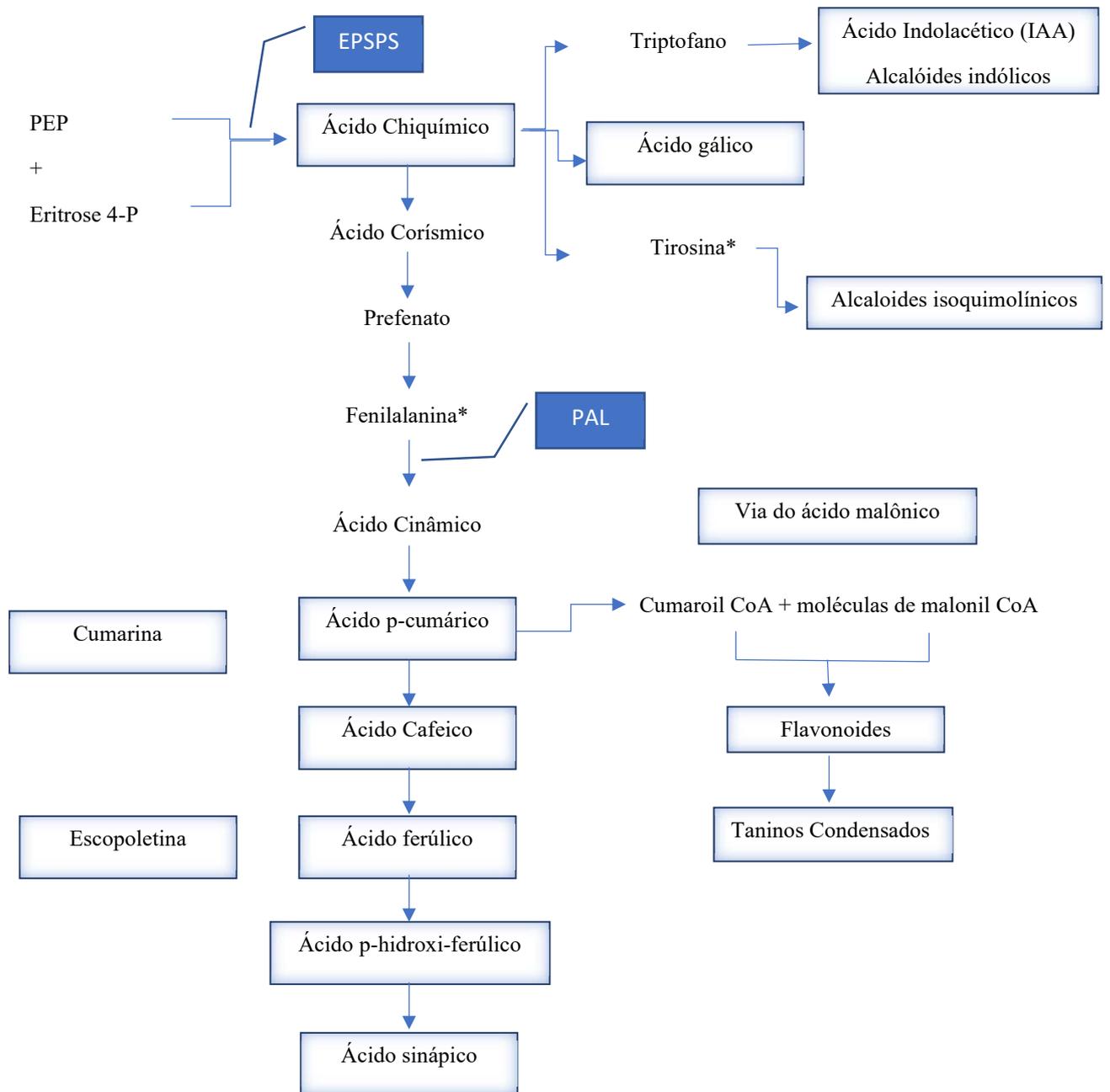
**Figura 07** – Estrutura química da Rotenona e da Deguelina. (Lambert *et al.*, 1998.)

Os rotenóides são substâncias de alto interesse econômico graças a suas propriedades inseticidas, piscicida, e farmacológicas amplamente relatadas na literatura (ZANG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2013). Dentre os rotenóides, a rotenona tem como característica ser muito tóxica para insetos por ser um veneno respiratório e apresentar baixa toxicidade para mamíferos (CROMBIE, 1984; LAMBERT *et al.*, 1998). A rotenona é uma molécula de média polaridade e pouco solúvel em água (ZUBAIRI *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm buscado mapear os quimiotipos em tefrócias, visto ser importante orientar o uso correto da planta de acordo as fitoalexinas presentes. Estas variam de acordo com vários fatores entre os quais a regulação do metabolismo secundário e a genética da planta. Estes fatores geram quimiotipos diferente não só em espécies diferentes, mas também na mesma espécie. Os rotenóides são compostos que são inibidores mitocondriais, da regeneração do NADH e são sintetizados a partir da L-fenilalanina pela na via do ácido shiquímico conforme Figura 08, desta via também derivam outros flavonóides, alcaloides e ligninas. E é através desta via que é sintetizada também o ácido Indol-3-Acético (AIA), uma auxina (KERBAUY, 2004).

A caracterização química de *Tephrosia vogelii* demonstra a presença de agentes que promovem o controle entomológico, tais como os rotenóides. Devido a estes compostos, esta espécie de tefrosia é amplamente utilizado em toda a África como pesticida (STEVENSON *et al.*, 2012). A caracterização dos compostos químicos ativos presentes na *Tephrosia vogelii* pode ser realizada através da extração de partes da planta, como folhas, ou de calos cultivados em meio de cultura. As extrações são realizadas com o uso de solventes orgânico obtendo-se extratos metanoicos, cetônicos e outros (LAMBERT *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2015; KARIUK *et al.*, 2018). Uma técnica muito utilizada para separação dos compostos e caracterização é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando detector de ultravioleta (UV) (CHENG *et al.*, 2015; LAMBERT *et al.*, 1998; DA COSTA *et al.*, 2016; BUSHWAY *et al.*, 1983; SANDVIK *et al.*, 2018; BELAMIM *et al.*, 2012; WENJIE *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação analítica muito utilizada pela sua sensibilidade, pela alta precisão para determinações quantitativas e para a análise de moléculas termicamente frágeis. É uma técnica utilizada na indústria e na ciência para identificação de moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, fármacos, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteróides, espécies metal-orgânicas e uma variedade de substâncias inorgânicas (SKOOG, 2001).



**Figura 08** - Biossíntese dos compostos fenólicos a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido malônico. (EPSPS: enzima 5-enolpiruvil-3-fosfochiquimato. PAL: enzima fenilalanina amônia-liase). \*Aminoácidos aromáticos. Fonte: Adaptado de FAGAN, (2015).

Os detectores de cromatografia líquida podem ser basicamente de dois tipos de propriedade de massa respondem a propriedade de da massa do analito presente na fase móvel e os detectores que respondem a propriedade físico-química do soluto e respondem a alguma propriedade de solutos, como por exemplo a propriedade de absorverem radiação no comprimento de onda do ultravioleta ou visível (SKOOG, 2006).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leguminosas Florestais e no Laboratório de Meio de Cultura da Embrapa Agrobiologia em Seropédica – Rio de Janeiro, durante os anos de 2020 a 2022.

Foram realizados três experimentos com o objetivo de atendimento aos objetivos específicos previamente definidos. Um primeiro experimento buscou a seleção de meios de cultura com diferentes combinações hormonais composições de auxinas e citocininas e dois tipos de explantes. Em um segundo experimento, a partir dos cinco melhores meios e explantes, buscou-se construir a curva de crescimento dos calos. Finalmente procurou-se avaliar os teores de rotenóides nas massas de calos em estudo.

#### **3.1. Definição do melhor explante para indução de calos vegetais friáveis com base em combinações de auxinas e citocinina**

O estabelecimento do protocolo de indução de calos a partir de explantes de cotilédones e hipocótilos de plântulas de *Tephrosia vogeli*. As sementes utilizadas foram obtidas de plantas cultivadas no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, na Fazenda Agroecológica localizada em Seropédica – RJ. Envolveu diferentes etapas as quais são apresentadas a seguir:

##### **a) Assepsia das sementes**

Sementes foram lavadas em água corrente por 5 minutos com auxílio de tela de náilon. Na sequência foi realizada a assepsia em cabine de fluxo laminar com álcool 70% o suficiente para cobrir as sementes, sendo estas agitadas suavemente por um minuto e a solução foi descartada.

Após o tratamento com o álcool, as sementes foram colocadas na presença de hipoclorito de sódio com concentração de 2 a 2,5 % (v/v) utilizando três gotas de detergente neutro para cada 100 mL de solução, sendo na sequência o frasco foi agitado suavemente durante 15 minutos. Após o descarte do hipoclorito, procedeu-se a lavagem das sementes com água destilada estéril, com cinco enxagues.

##### **b) Semeadura e Germinação**

A semeadura para obtenção de explantes de sementes germinadas em ambiente estéril foi realizada utilizando-se 4,2 gramas por litro de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 30 g/L de sacarose solubilizados água destilada. Após adição de 9,5 g/L de ágar o pH foi ajustado em  $5,8 \pm 0,2$  e o meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após total gelificação do meio foram semeadas 15 sementes por frascos.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, temperatura de 28 °C. Com a expansão dos cotilédones, após um período de 15 dias, o material estava pronto para retirada dos explantes.

##### **c) Indução de calos vegetais**

A indução de calos foi realizada em meio contendo 4,2 g/L de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com adição de 30 g/L de sacarose como fonte de carboidratos. Suplementou-se o meio com 0,01

g/L de tiamina e 0,1 g/L de mio-inositol solubilizados em água destilada. Após adição de 9,5 g/L de ágar o pH foi ajustado em  $5,8 \pm 0,2$  previamente à autoclavagem.

Os reguladores de crescimento foram preparados na concentração de 1,0 mg/mL e solubilizados conforme descrito na Tabela 01. Após solubilização dos reguladores, procedeu-se a esterilização destes mediante filtração em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  em cabine de segurança para posterior adição no meio já esterilizado. Após este procedimento os reguladores foram armazenados congelados.

**Tabela 01** – Reguladores de crescimento usados na pesquisa frente ao procedimento de solubilização, esterilização e armazenamento utilizado. [Adaptado de Quisen, (2008) e Paiva, (2001)]

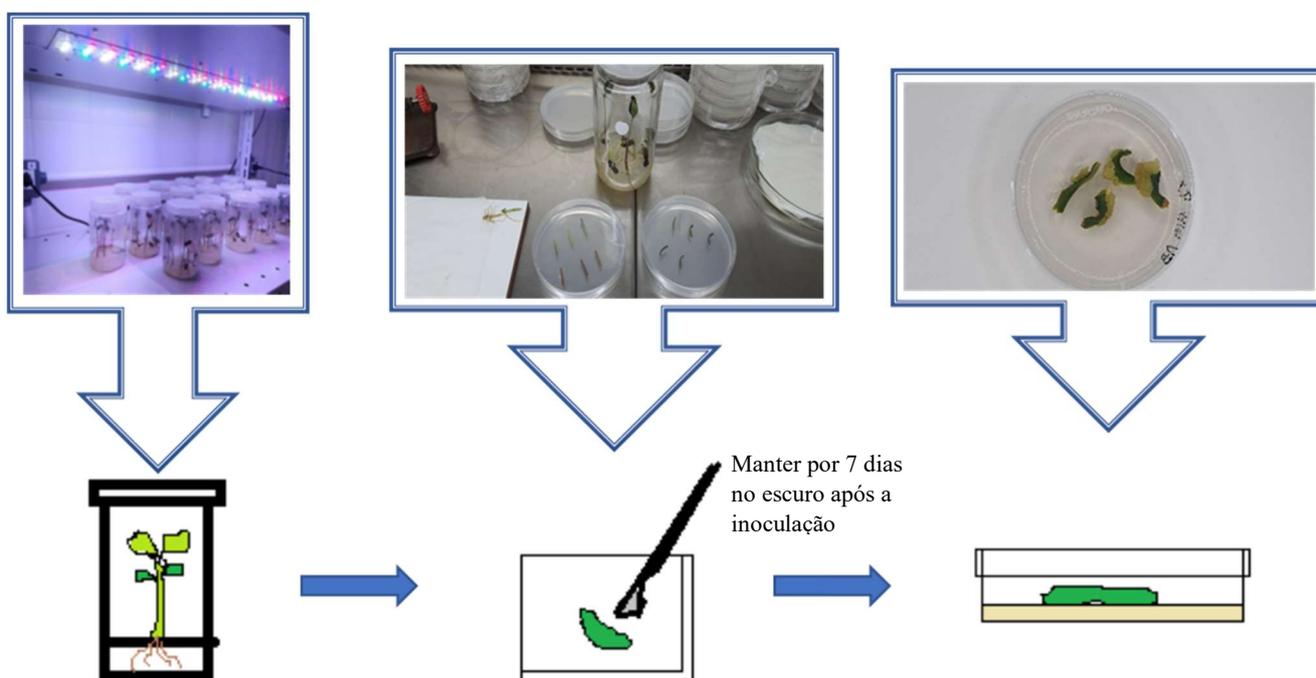
<b>Regulador</b>	<b>Classe</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Esterilização</b>	<b>Armazenamento</b>
<b>BAP (6-benzil amino purina)</b>	Citocinin a	Gotas de HCl a 1M	Filtragem filtro de 0,22 $\mu\text{m}$	Congelamento
<b>2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético)</b>	Auxina	Gotas de NaOH ou KOH a 1M; Etanol	Filtragem 0,22 $\mu\text{m}$	Congelamento
<b>AIA (ácido Indol-3-acético)</b>	Auxina	Gotas de NaOH a 1M; Etanol	Filtragem 0,22 $\mu\text{m}$ (degrada em altas temperatura ou exposto a radiação ultravioleta)	Congelamento
<b>ANA (ácido naftaleno acético)</b>	Auxina	Gotas de NaOH a 1M	Filtragem 0,22 $\mu\text{m}$	Congelamento

Para estudo da obtenção de calos os reguladores de crescimento foram adicionados aos meios de cultura já autoclavados em ambiente de cabine de fluxo laminar. Nos ensaios realizados adotou-se os tratamentos descritos na Tabela 02 considerando-se como controle a ausência de reguladores hormonais no meio de cultura.

**Tabela 02** – Definição das concentrações dos reguladores de crescimento utilizados nos diferentes tratamentos avaliados empregados para indução de formação de calos a partir de explantes de *Tephrosia vogelii* no presente trabalho (Adaptado, Thirupaty et al., 2014 e Lambert et al., 1998).

Tratamentos	Descrição
1	Controle 0 mg/L de reguladores
2	1,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
3	2,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
4	0,5 mg/L de <b>BAP</b>
5	0,5 mg/L de <b>BAP</b> e 1,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
6	0,5 mg/L de <b>BAP</b> e 2,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
7	0,25 mg/L de <b>BAP</b>
8	0,25 mg/L de <b>BAP</b> e 1,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
9	0,25 mg/L de <b>BAP</b> e 2,0 mg/L de <b>2,4-D</b>
10	0,5 mg/L de <b>BAP</b> e 1,0 mg/L de <b>AIA</b>
11	0,5 mg/L de <b>BAP</b> e 2,0 mg/L de <b>AIA</b>
12	0,25 mg/L de <b>BAP</b> e 1,0 mg/L de <b>AIA</b>
13	0,25 mg/L de <b>BAP</b> e 2,0 mg/L de <b>AIA</b>
14	0,25 mg/L de <b>BAP</b> e 1,0 mg/L de <b>ANA</b>

Durante a pesquisa foram conduzidos experimentos, os quais serão descritos a seguir, sendo que todos os tratamentos contaram com 10 replicatas realizadas em placas de 90 mm x 15 mm com 6 explantes em cada placa. A inoculação do explante foi realizada após a expansão dos cotilédones cerca de 15 dias após a semeadura como descrito na Figura 09. Para esta pesquisa foram utilizados explantes de cotilédones e de hipocótilos.



**Figura 09** – Esquema de inoculação dos explantes utilizado durante os diferentes tratamentos, realizados em cabine de fluxo laminar. (Desenvolvido pela autora)

Um primeiro experimento foi conduzido com dois ensaios objetivando a seleção do melhor meio indutor de massa de calos friáveis calos vis-à-vis, comparativamente ao melhor explante entre cotilédone e hipocótilo foram usados os tratamentos T1, T5, T6, T8, T9, T10, T11, T12 e T13 para o primeiro ensaio e para o segundo ensaio foram usados os meios T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9, conforme descritos na Tabela 02. Neste experimento não foi utilizado o tratamento o tratamento 14 que durante os experimentos realizados posteriormente será utilizado como tratamento para comparação (controle) do crescimento e dos teores de rotenona. Este tratamento foi definido como controle a partir das referências bibliográficas.

Foram inoculados seis explantes por placa descartável de 90 mm x 15 mm com 20 mL de meio, já adicionados os reguladores de crescimento. Cada tratamento foi realizado com 10 replicatas para cada explante. O explantes hipocótilo, foi dividido em até 3 partes e o cotilédone em duas partes, sendo este cortado no sentido do corte transversal e retirada cerca de 3 mm das extremidades.

Após a inoculação, os explantes eram mantidos no escuro por uma semana, com o objetivo de reduzir as chances de oxidação dos explantes. Terminado este período os explantes eram deixados sob luz por 24 horas com 170 lux na presença de diodos emissores de luz (LEDs) branco, vermelho e verde, a uma temperatura de 28 °C.

Semanalmente as placas eram avaliadas quanto a presença de contaminação de fungos ou bactérias, as placas com contaminação eram descartadas. Durante esse procedimento era realizado o rodízio das placas na posição da estante e na fila formada pelas placas. As placas eram seladas com filme plástico e mantidas em sala de crescimento sob luz constante. A repicagem da cultura foi realizada a cada 21 dias (LAMBERT et al, 1998), mantendo as mesmas condições de meio. Para avaliação dos efeitos dos reguladores no processo de inicialização dos calos foi considerada as primeiras três passagens (63 dias). Contudo foi avaliada a capacidade da cultura se manter ao longo de 5 subculturas (105 dias) A avaliação dos efeitos das combinações das auxinas AIA e 2,4-D com a citocinina BAP ocorreu em dois ensaios.

Os calos foram avaliados quanto a intensidade de formação, densidade dos calos e coloração.

Para a intensidade de formação foi avaliado se o calo apresentou brotação e a disposição dos mesmos ao longo do explante, representado com a seguinte sinalização:

- (-) para explante que apresentava apenas entumescimento, porém não apresentava brotações (massa celular indiferenciada) de calos;
- (+) para o explante apresentava pequenos brotos sem desenvolvimento ao longo do explante;
- (++) para o explante que apresentava desenvolvimento de brotos apenas nas extremidades do explante;
- (+++)

Para a densidade foi avaliado a organização celular dos calos se apresentavam compactas (células unidas sem desprendimento de massa celular) ou friáveis (células com uma organização “frouxa” apresentando desprendimento de massa celular).

A coloração do calo foi classificada em verde escuro (VE), verde claro (VC), Branco (BR), Amarela (AM), Marrom (MR) (ZAFAR *et al.*, 2002; RANJITHA *et al.*, 2018).

### 3.2. Estabelecimento da curva de crescimento do calo a partir da combinação de reguladores de crescimento e explantes de *Tephrosia vogelii* previamente selecionados.

Neste experimento foram utilizados os meios T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D), T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) e T14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA), com base na indução de calos friáveis observados no experimento 1, conforme descrito a seguir.

Os explantes selecionados foram aqueles obtidos dos cotilédones, sendo utilizados 2 explantes por placas.

Os experimentos foram conduzidos utilizando placa de 60 mm x 15 mm, sendo adicionado dois explantes por placa, constituindo-se cada placa uma unidade amostral. Foram adotados os mesmos procedimentos de obtenção dos calos friáveis dos experimentos 1.

Após a inoculação dos explantes as placas foram mantidas no escuro por sete dias para evitar a oxidação dos explantes e as coletas para definição da curva de crescimento e taxa de crescimento foram iniciadas após três dias de exposição a luz.

A curva de crescimento foi construída avaliando-se o ganho de massa no calo celular, conforme preconizado por Lambert *et al.*, (1998), Paiva, (2001) e George, (1993). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, avaliando-se três repetições, sendo cada repetição constituída de duas unidades experimentais (2 calos), totalizando seis calos por tratamento.

A cada três dias, os calos de três plaquinhas eram pesados quanto a massa fresca e massa seca utilizando-se balança analítica de quatro casas. Após pesagem da matéria fresca, de cada replicata a mesma era colocada em um envelope de papel de 15 x 10 cm e depois seca em estufa a 60 °C por 24 horas. Após este período era determinada a massa seca do material através da pesagem em balança analítica de quatro casas.

A obtenção das curvas de massa fresca e massa seca foi realizada a partir do cálculo da média das massas pesadas em cada dia de coleta e plotadas em uma curva que estabeleceu a relação entre a massa em gramas (ordenadas) e o tempo em dias (abscissas).

A obtenção da curva de taxa de crescimento foi realizada utilizando o cálculo da média das massas frescas pesadas em cada dia de coleta submetidas ao cálculo do percentual de crescimento determinado através da subtração do peso da matéria fresca final (PF) no dia da coleta pelo peso da matéria fresca inicial obtido pela média dos explantes não inoculados (PI), dividindo este valor pelo peso da matéria fresca final e multiplicando o resultado por 100, segundo a fórmula:  $[(PF - PI) / PF] \times 100$  (LAMEIRA, 2000). Os valores foram plotados em uma curva que estabeleceu a relação entre a porcentagem de crescimento (ordenadas) e o tempo em dias (abscissas).

### 3.3 Determinação da concentração de rotenona e deguelina em calos de *Tephrosia vogelii*

Para a determinação da concentração dos rotenóides, rotenona e deguelina, em calos de *T. vogelii*, foram selecionados os tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D), T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) e T14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA). O experimento foi conduzido com base no experimento de indução de calos friáveis (experimento 1), utilizando-se como explante cotilédones obtidos de sementes germinadas em meio estéril.

Os experimentos foram conduzidos utilizando placa de 60 mm x 15 mm, sendo adicionado dois explantes por placa, constituindo-se cada placa uma unidade amostral. Foram adotados os mesmos procedimentos de obtenção dos calos friáveis dos experimentos 1.

Após a inoculação de 2 explantes por placas, as mesmas foram mantidas no escuro por sete dias para evitar a oxidação dos explantes. As coletas para análise foram realizadas após o crescimento dos calos conforme protocolo definido no item em 3.1, sendo realizada a coleta de seis placas por coleta em um total de três coletas. Foi realizado o recultivo dos calos a cada 21 dias. Foram realizadas análises da concentração de rotenona e deguelina nas coletas de 21, 42 e 63 dias.

Os calos coletados foram avaliados quanto a intensidade de formação, densidade, coloração, identificados e armazenados em freezer -80 °C, após a conclusão de todas as coletas as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido na presença de 10 % (m/m) de PVPP (Polivinilpirrolidona, Sigma) para evitar oxidação do material e, posteriormente armazenadas novamente em superfreezer a -80 °C.

A extração foi realizada partir da massa de 0,5 g do material macerado. A esta massa foi adicionado 1 mL metanol grau P.A e submetido a ultrassom por 20 minutos (adaptado de WENJIE et al., 2009; WANG et al., 2015). A fase líquida foi filtrada com auxílio de seringa de 1 mL com filtro de filtro de 0,22 µm acoplado na ponta. Os extratos obtidos foram inseridos em frascos de vidro de 2 mL com tampa de rosca e armazenados em superfreezer a -80 °C até o momento da injeção.

As análises de identificação da rotenona e da deguelina foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As mesmas foram realizadas em cromatógrafo modelo Shimadzu LC-20 Prominace, equipado com detector Shimadzu SPD- 20 AV operando no UV-VIS. A detecção foi realizada em 293 nm para rotenona e 270 nm para deguelina de acordo com absorção satisfatória para cada analito relatado no espectro UV. Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa (Purospher® STAR RP-18e endcapped -5 µm). Em forno Shimadzu CTO-20A, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C.

A corrida cromatográfica foi realizada de modo isocrático usando uma fase móvel composta de 70% de metanol grau HPLC e 30% de água ultrapura (MilliQ) em um tempo total de 15 min de corrida com objetivo de separar rotenona e deguelina, O volume de injeção utilizado foi de 20 µL, com taxa de fluxo de 1,5 mL/ min (Adaptado de BUSHWAY, 1983; COSTA 2016).

O controle e a aquisição de dados HPLC foi realizada usando o software LC-Solution (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão, Versão 1.25 SP2).

O cálculo das concentrações foi realizado a partir de uma curva de calibração e monitoramento das análises foi realizada a partir da injeção de controles que foram injetados com cada lote de amostras.

Para preparo das curvas e das soluções controle para monitoramento das injeções uma solução estoque de 1000 µg./mL contendo os dois compostos de referência, rotenona (Sigma 99%) e deguelina (MedChemExpress 99,29%) foi preparada. Para preparo da curva de calibração foram realizadas diluições em metanol da solução estoque em até sete concentrações para obter as soluções de trabalho nas concentrações de 0,25; 1,0; 5,0; 10; 25; 50; 150; 250; e 350 µg / mL. A média das áreas obtida de cada injeção em cada concentração foram utilizadas para a curva de calibração e a partir das mesmas foram realizados o cálculo das concentrações dos analitos. Os cálculos da média das concentrações das amostras injetadas em triplicata e da testemunha foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey (p<0,05) avaliando a variação das concentrações dentro da mesma coleta.

A partir das soluções estoque foram preparados os controles em três níveis de controle de qualidade contendo rotenona e deguelina nas concentrações de 5,0 (Baixa), 10,0 (Média) e 50,0 (Alta) µg /mL realizando diluições apropriadas em metanol P.A. a partir da solução estoque. Estas foram preparadas e injetadas junto a cada lote de amostra, tinha a função de monitorar as condições cromatográficas (tempo de retenção do analito, condições da coluna, entre outras) agindo como controle de cada análise.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Definição do melhor explante para indução de calos vegetais friáveis com base em combinações de auxinas e citocinina

Após 21 dias de inoculação constatou-se comportamento diferencial dos explantes no tocante a presença de diferentes formações conforme o explante e reguladores de crescimento utilizados. Foram realizadas 05 subculturas a cada 21 dias mantendo-se as mesmas combinações das auxinas AIA e 2,4-D e citocinina BAP conforme combinações de tratamentos descritas na tabela 2. Após 3 subculturas obteve-se os resultados de efeito dos reguladores de crescimento na inicialização de calos em explantes de cotilédone e hipocótilo apresentados na tabela 03. A tabela 04 apresenta os resultados obtidos com os tratamentos com os reguladores após 3 subculturas. Os resultados se repetiram na quarta subcultura e na quinta subcultura foi observado um severo processo de escurecimento e senescência dos calos.

**Tabela 03** – Efeito dos reguladores de crescimento na inicialização de calos em explantes de cotilédone e hipocótilo após 03 subculturas. Primeiro ensaio realizado.

Tratamento	Regulador de Crescimento em mg/L			Tipo do explante	Intensidade de Formação <sup>a</sup>	Coloração do Calo <sup>b</sup>	Densidade do calo <sup>c</sup>
	AIA	2,4-D	BAP				
1	-	-	-	Cotilédone	Intumescimento	--	--
				Hipocótilo	Intumescimento	--	--
5	-	1,0	0,5	Cotilédone	+++	VE/B	C
				Hipocótilo	++	VE/B	C
6	-	2,0	0,5	Cotilédone	+++	VC/B/AM	F/C
				Hipocótilo	+++	VE/B	C
8	-	1,0	0,25	Cotilédone	+++	VC/B/A	F/C
				Hipocótilo	+++	VC/B/A	F/C
9	-	2,0	0,25	Cotilédone	+++	VC/B/A	F/C
				Hipocótilo	+++	VC/B/AM	F/C
10	1,0	-	0,5	Cotilédone	Intumescimento	--	--
				Hipocótilo	Intumescimento	--	--
11	2,0	-	0,5	Cotilédone	Intumescimento	--	--
				Hipocótilo	+	VE	C
12	1,0	-	0,25	Cotilédone	+	VE	C
				Hipocótilo	+	VE/MA	C
13	2,0	-	0,25	Cotilédone	Intumescimento	--	--
				Hipocótilo	Intumescimento	--	--

<sup>a</sup>Avaliação da formação dos calos conforme sua presença/ausência de brotos na extensão. Intumescimento: inchaço com aumento de volume sem emissão de calo; (+): intumescimento do explante com a emissão de pequenos brotos; (++) : emissão moderada de calos correspondendo a aproximadamente ½ da região exposta do explante; (+++): a emissão em toda da área exposta do explante.

<sup>b</sup>Avaliação da coloração: BR- Branco, AM- amarelo, VC- verde claro, VE- verde escuro e Marrom.

<sup>c</sup>Avaliação de densidade: C- compacto e F- friável.

**Tabela 04** - Efeito dos reguladores de crescimento na inicialização de calos em explante de cotilédone e hipocótilo após 3 subculturas. Segundo ensaio realizado.

Tratamento	Regulador de Crescimento mg/L		Tipo do explante	Intensidade de Formação <sup>a</sup>	Coloração do Calo <sup>b</sup>	Densidade do calo <sup>c</sup>
	2,4-D	BAP				
1	-	-	Cotilédone	Intumescimento	--	--
			Hipocótilo	Intumescimento	--	--
2	1,0	-	Cotilédone	+++	VC/AM/BR	F
			Hipocótilo	++	BR/AM/VC/VE	F
3	2,0	-	Cotilédone	+++	VC/AM/BR	F
			Hipocótilo	++	BR/AM/VC/VE	F/C
4	-	0,5	Cotilédone	Intumescimento	--	--
			Hipocótilo	Intumescimento	--	--
5	1,0	0,5	Cotilédone	++	BR/VE	C
			Hipocótilo	++	BR/VE	C
6	2,0	0,5	Cotilédone	++	BR/VC/VE	F/C
			Hipocótilo	++	BR/VE	C
7	-	0,25	Cotilédone	Intumescimento	--	--
			Hipocótilo	Intumescimento	--	--
8	1,0	0,25	Cotilédone	+++	VC/VE/B/AM	F/C
			Hipocótilo	++	BR/VE/MR	F/C
9	2,0	0,25	Cotilédone	+++	VC/VE/B/AM	F/C
			Hipocótilo	++	BR/VE/MR	F/C

<sup>a</sup>Avaliação da formação dos calos conforme sua presença/ausência de brotos na extensão. Intumescimento: inchaço com aumento de volume sem emissão de calo; (+): intumescimento do explante com a emissão de pequenos brotos; (++) : emissão moderada de calos correspondendo a aproximadamente ½ da região exposta do explante; (+++): a emissão em toda da área exposta do explante.

<sup>b</sup>Avaliação da coloração: BR- Branco, AM- amarelo, VC- verde claro, VE- verde escuro e Marrom.

<sup>c</sup>Avaliação de densidade: C- compacto e F- friável.

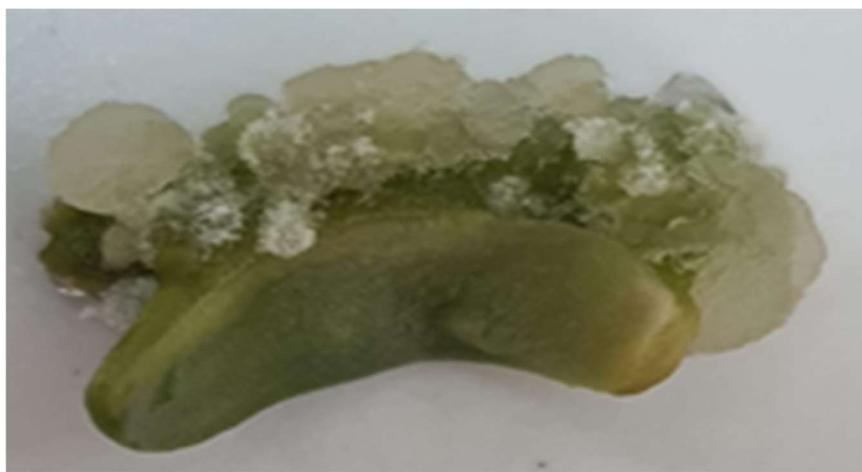
A combinação entre a auxina AIA e a citocinina BAP em diferentes concentrações não apresentou resposta favorável a indução de calos, gerando respostas muito baixas (+) ou inexistentes (-). Tal resposta parece evidenciar que explantes de são dependentes da adição de reguladores ao meio para indução da formação de calos. Alguns explantes podem ser dependentes da adição de reguladores outros podem usar os reguladores internos (GEORGE, 1993). Uma das auxinas mais usadas para indução de calos é o 2,4-D (FEITOSA, 2011). De fato, os tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D) e o T3 (2,0 mg/L de 2,4-D) onde usou-se apenas o 2,4-D foram capaz de induzir calos.

Considerando os diferentes tratamentos em estudo constatou-se que os melhores resultados para a indução de calos foram obtidos com o uso da combinação de 2,4-D e BAP. Esta observação confirma o constatado por Thirupathy *et al.* (2014) em estudos com *Tephrosia hookeriana* a partir de explantes de folha, onde os melhores calos foram obtidos à partir de explante de folhas na presença de BAP e 2,4D.

Nos tratamentos T4 (0,5 mg/L de BAP) e T7(0,25 mg/L de BAP) onde foi utilizada apenas a citocinina BAP não foram formados calos. Ranjitha (2018) utilizando BAP em concentrações que variavam de 2,22 µM a 8,88µM em explantes de folha de *Tephrosia villosa* obteve resultados

semelhantes ao observado neste trabalho. Entretanto Zaffar, (2002) em estudos com explantes de raiz de *Tephrosia purpurea* obteve fraca formação de calos utilizando BAP em concentração 4,43 $\mu$ M. Citocininas como o BAP desempenham um importante na divisão e na diferenciação celular, porém a divisão celular vai depender do balanço entre auxina e citocinina principalmente em cultura de tecidos (FAGAN, 2015).

Os calos apresentaram brotos (aglomerados de células com mesma organização de tecido na superfície do explante) com diferentes tipos de tecido, diferindo em aparência, cor, grau de compactação (densidade) e potencial morfogenético. Calos friáveis (macios) obtidos no experimento apresentaram coloração verde claro e ou amarela como observado na Figura 10, enquanto os calos compactos apresentaram coloração verde escura ou branca como observado na Figura 11. Constatou-se o escurecimento dos calos ao longo do tempo com as passagens, evidenciando a formação de material oxidado de coloração marrom.



**Figura 10** – Calos friáveis obtidos de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* no meio com 0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D (Tratamento 9). Fonte: Acervo do autor



**Figura 11** – Calos compactos obtidos de explante de hipocótilo de *Tephrosia Vogelii* no meio com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L 2,4-D (Tratamento 08). Fonte: Acervo do autor

A origem do explante, seu grau de diferenciação e a idade podem influenciar na formação dos calos (GEORGE, 1993). Constatou-se nos tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D) e T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), no explante de cotilédone, ocorreu formação de calo um mais homogêneo com organização celular friável.

Nos tratamentos T6 (Explante cotilédone), T8 e T9 (Explantes hipocótilo e cotilédone) foram observados calos tanto com material celular friável e compacto estando associado a ação da citocinina no processo de crescimento celular. Calo apresentando característica tipo “compacto” pode apresentar maior lignificação sendo mais indicado para regeneração de plantas, enquanto calos frouxamente organizados ou “friável” é geralmente selecionado para iniciar culturas em suspensão em meio líquido (PAIVA, 2001). Para estabelecimento de um protocolo de micropropagação além de considerar o explante utilizado, é importante considerar o genótipo da planta-matriz em resposta aos estímulos “in vitro”. Os tecidos que compõem o explante podem conter ou não reguladores de crescimento o faz com que alguns explantes sejam dependentes da presença de reguladores de crescimento exógeno no meio (STEIN *et al.*, 2009).

No experimento realizado, os melhores tratamentos para a combinação de intensidade das células com organização frouxa, padrão “friável” foram o T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) e T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D).

#### **4.2 Estabelecimento da curva de crescimento dos calos para as diferentes combinações de auxinas e citocininas**

A curva de crescimento foi construída considerando os tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D); T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) que permitiram obtenção de calos friáveis. Adicionalmente foi acrescido o tratamento T14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA) conforme preconizado por (LAMBERT *et al.*, 1993). As Figuras 11 a 15 referem-se aos tratamentos utilizados para a construção das curvas de crescimento, apresentando o desenvolvimento dos calos aos sete dias de crescimento sem luz, após três dias de crescimento na presença de luz e no último dia de coleta da construção da curva.

As pesagens dos calos foram iniciadas após dez dias de inicialização da cultura, sendo as pesagens realizadas conforme descrito na metodologia.

No tratamento T2 (1,0 mg/L de 2,4-D) na retirada do ambiente escuro pode ser observada a inicialização do processo de formação de calos na borda do explante em contato com o meio (Figura 12 A) e três dias depois pode ser observada a formação de massa friável ao longo do explante (Figura 12 B). No final de 40 dias (Figura 12 C) pode-se observar o aumento da massa de calo e o escurecimento do calo em função da oxidação do mesmo.

Figura 12 A



Figura 12 B



Figura 12 C



**Figura 12** – Crescimento de calos de *Tephrosia vogelii* em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D (T02). Em A explantes após sete dias na sala de crescimento sem luz. Em B explante três dias na câmara de crescimento sob efeito de luz. Em C explante no último dia de coleta.

No tratamento T3 (2,0 mg/L de 2,4-D) na retirada do ambiente escuro pode ser observada a inicialização do processo de formação de calos na borda do explante em contato com o meio (Figura 13 A) e três dias depois pode ser observada a formação de massa friável ao longo do explante (Figura 13 B). No final de 40 dias (Figura 13 C) pode-se observar o aumento da massa de calo e o escurecimento do calo em função da oxidação do mesmo.

Figura 13 A



Figura 13 B



Figura 13 C



**Figura 13** – Crescimento de calos de *Tephrosia vogelii* crescidos em meio com 2,0 mg/L de 2,4-D (T03). Em A explantes após sete dias na sala de crescimento sem luz. Em B explante três dias na câmara de crescimento sob efeito de luz. Em C explante no último dia de coleta.

No tratamento T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) na retirada do ambiente escuro pode ser observada a inicialização do processo de formação de calos na borda do explante em contato com o meio (Figura 14 A) e três dias depois pode ser observada a formação de brotos ao longo do explante com calos friáveis e compactos (Figura 14 B). No final de 40 dias (Figura 14 C) pode-se observar o aumento da massa de calo com diferentes calos ao longo do explante.

Figura 14 A

Figura 14 B

Figura 14 C



**Figura 14** – Crescimento de calos de *Tephrosia vogelii* crescidos em meio com 0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D (T08). Em A explantes após sete dias na sala de crescimento sem luz. Em B explante três dias na câmara de crescimento sob efeito de luz. Em C explante no último dia de coleta.

No tratamento T14 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) na retirada do ambiente escuro pode ser observada a inicialização do processo de formação de calos na borda do explante em contato com o meio (Figura 15 A) e três dias depois pode ser observada a formação de brotos ao longo do explante com calos friáveis e compactos (Figura 15 B). No final de 40 dias (Figura 15 C) pode-se observar o aumento da massa de calo com diferentes calos ao longo do explante. No tratamento 9 foi observado a formação de mas calos friáveis ao longo do explante.

Figura 15 A

Figura 15 B

Figura 15 C



**Figura 15** – Crescimento de calos de *Tephrosia vogelii* crescidos em meio com 0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D (T09). Em A explantes após sete dias na sala de crescimento sem luz. Em B explante três dias na câmara de crescimento sob efeito de luz. Em C explante no último dia de coleta.

No tratamento 14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA) na retirada do ambiente escuro pode ser observada a inicialização do processo de formação de calos na borda do explante em contato com o meio (Figura 16 A) e três dias depois pode ser observada a formação de brotos ao longo do explante com calos compactos (Figura 16 B). No final de 40 dias (Figura 16 C) pode-se observar o aumento da massa de calos ao longo do explante porém em proporção menor se comparado com os outros tratamentos e ocorreu o escurecimento dos calos.

Figura 16 A



Figura 16 B



Figura 16 C



**Figura 16** – Crescimento de calos de *Tephrosia vogelii* crescidos em meio com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L ANA (T14). A figura A é a foto dos explantes após sete dias na sala de crescimento sem luz. A figura B é a foto do explante três dias na câmara de crescimento sob efeito de luz. A figura C é a foto do explante no último dia de coleta

O tratamento T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) apresentou calos friáveis e com menos sinais de oxidação em comparação com os tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D) e T3 (2,0 mg/L de 2,4-D) que apesar de apresentar calos mais friáveis apresentaram também sinais severos de oxidação quando comparados com calos do tratamento 9 com a mesma idade. Thirupaty., (2014) observou comportamento semelhante em calos com idade de 4 semanas com concentrações semelhante de 2,4-D em *Tephrosia hookeriana*.

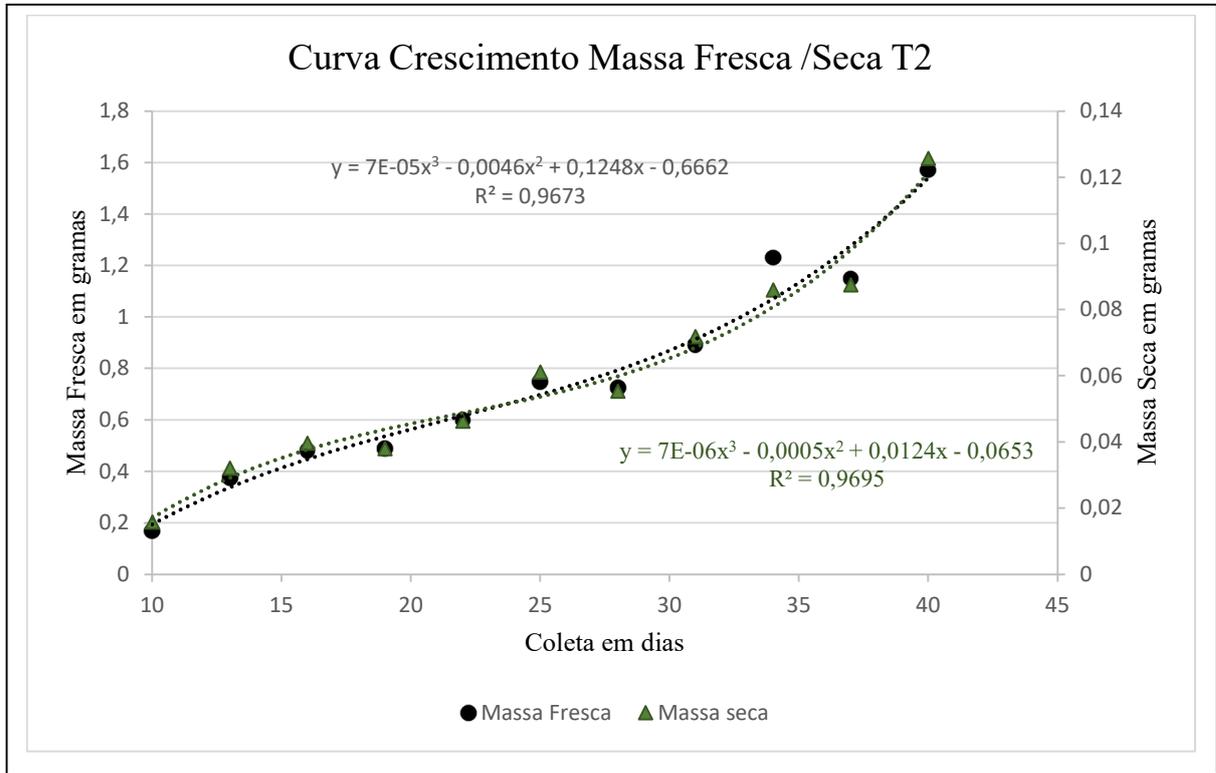
A curva de crescimento dos calos tem a função de determinar as fases de crescimento da cultura para encontrar o momento ideal para que sejam realizadas subculturas ou recultivo (SANTOS *et al*, 2010). Em geral apresentam padrão sigmoide de crescimento com seis fases entre as quais a fase lag, fase exponencial, fase linear, fase de desaceleração, fase estacionária e declínio (PAIVA, 2001). O momento ideal para realizar a passagem, ou seja, dar início a uma subcultura é no final da fase exponencial, podendo ser adiado dependendo da espécie vegetal (GEORGE, 1993). Santos, (2010) em estudos de curva de crescimento com café conilon descreve a melhor fase para transplante como sendo a fase de desaceleração. Estudos com *Tephrosia* realizam as subculturas em torno de 21 dias (LAMBERT *et al.*, 1998; ZAFFAR *et al.*, 2002; RANJITHA *et al.*, 2018).

No experimento realizado constatou-se que, dependendo do tratamento hormonal, não foi possível verificar a presença das seis fases. Estudos realizados por Souza, (2015) demonstraram que o padrão da curva de crescimento apresenta diferentes respostas de acordo com o tecido usado e a espécie que está sendo avaliada (ROSSATO, 2015). Este padrão de curva é característico de tecido desdiferenciado

As curvas de crescimento foram obtidas a partir de material de calo em crescimento com intervalo de três dias. Para efeito de construção da curva foram utilizadas médias de três placas. O inóculo inicial tinha massa média de 0,0805 g. As Figuras de 16 a 20 apresentam as curvas de massa fresca e massa seca referentes aos diferentes tratamentos e a curva de taxa de crescimento na figura 21.

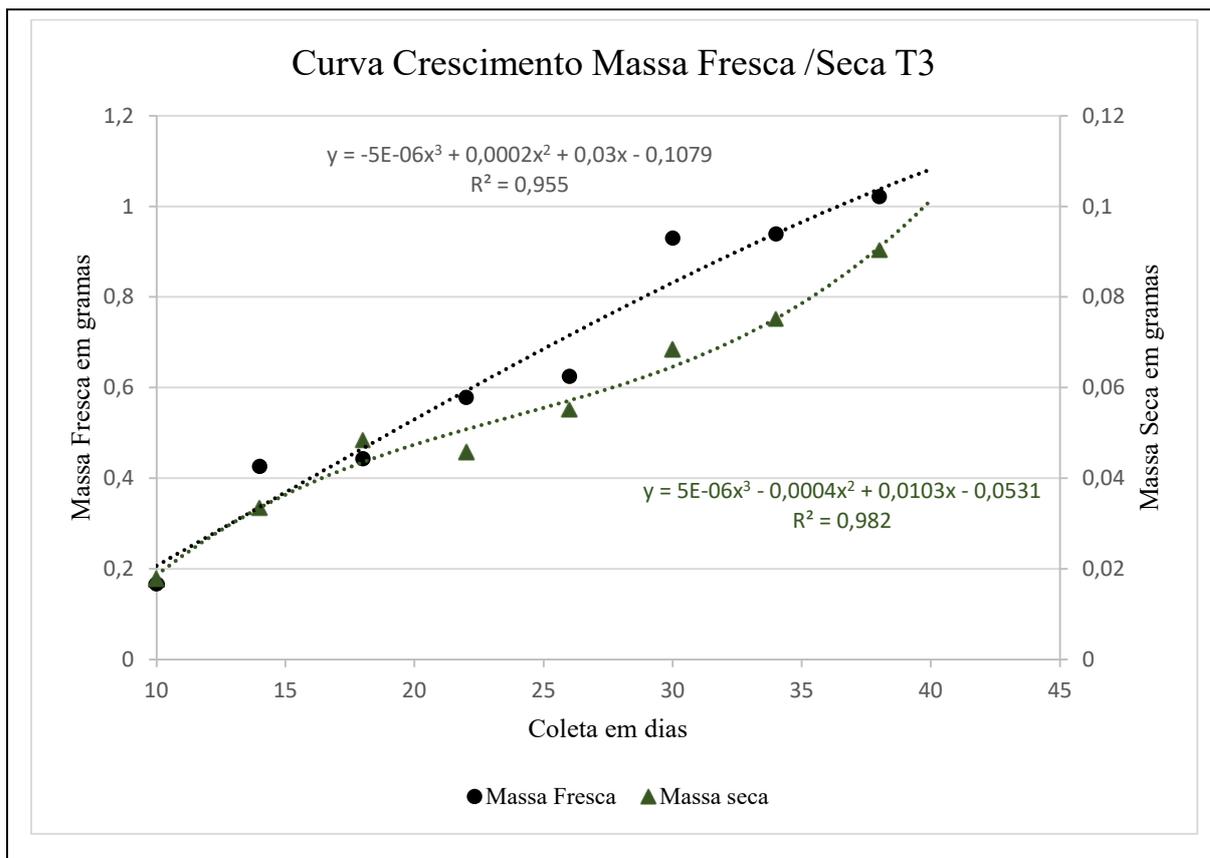
As curvas de crescimento de massa fresca e massa seca obtidas com o meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D, (T02) (Figura 17), apresentaram a fase de crescimento exponencial ocorrendo

do décimo ao décimo nono dia, a fase de crescimento linear do vigésimo ao trigésimo quinto dia e o início da fase de desaceleração no trigésimo sexto dia. O aumento da massa fresca ocorreu do décimo dia ao trigésimo quinto dia. No período preconizado pela literatura (em torno de 21 dias) os calos estavam no início da fase linear e apresentou a massa de 0,5743g o que é 7,1 vezes mais que a massa média inicial e uma taxa de crescimento de aproximadamente 86% (Figura 22).



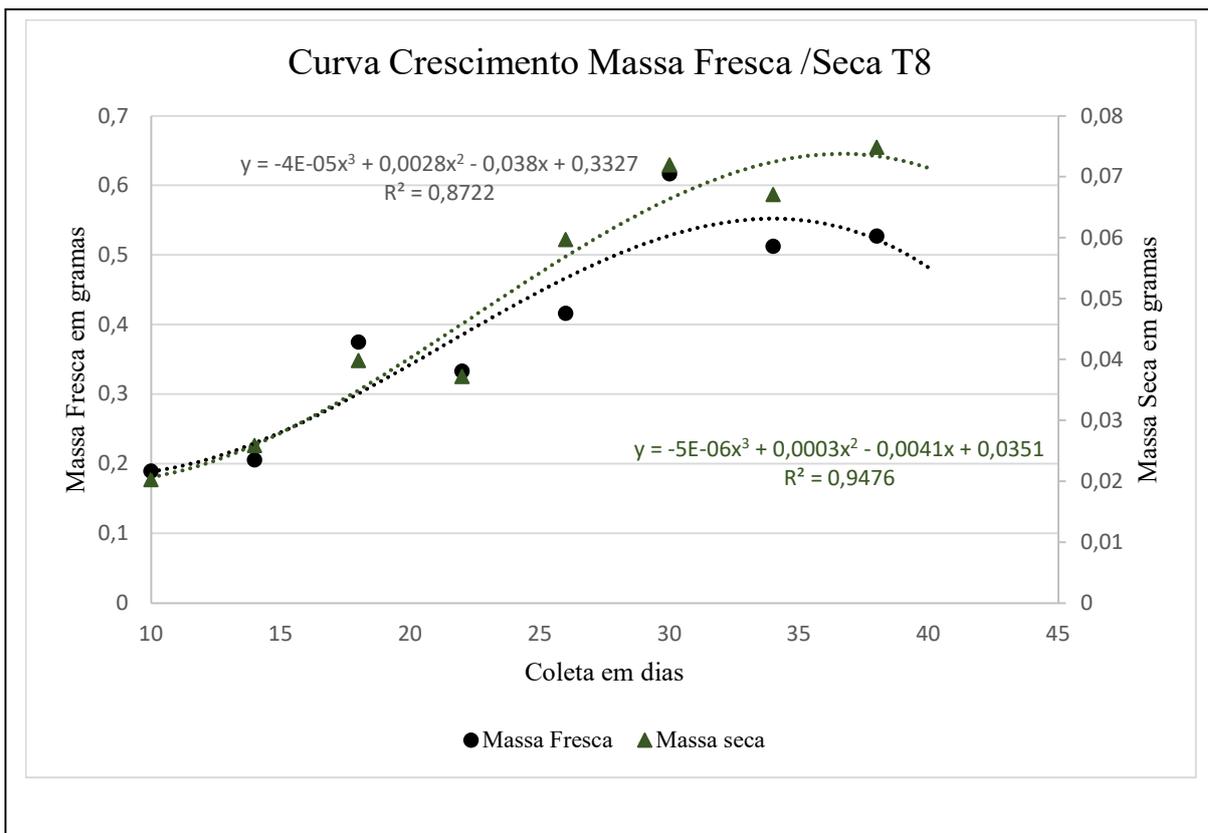
**Figura 17** – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4- D.

As curvas de crescimento de massa fresca e massa seca obtidas com o meio MS meio suplementado com 2,0 mg/l de 2,4-D (T03) (Figura 18), apresentaram a fase exponencial do décimo ao décimo nono dia, a fase linear ocorreu do vigésimo ao trigésimo quarto dia e a fase de desaceleração foi observada a partir do trigésimo quinto dia. O aumento da massa fresca ocorreu do décimo dia ao trigésimo quinto dia. No período preconizado pela literatura (em torno de 21 dias) os calos estavam no início da fase linear e apresentou a massa média de 0,6053 g o que é 7,5 vezes mais que a massa inicial e uma taxa de crescimento de aproximadamente 85% (Figura 22).



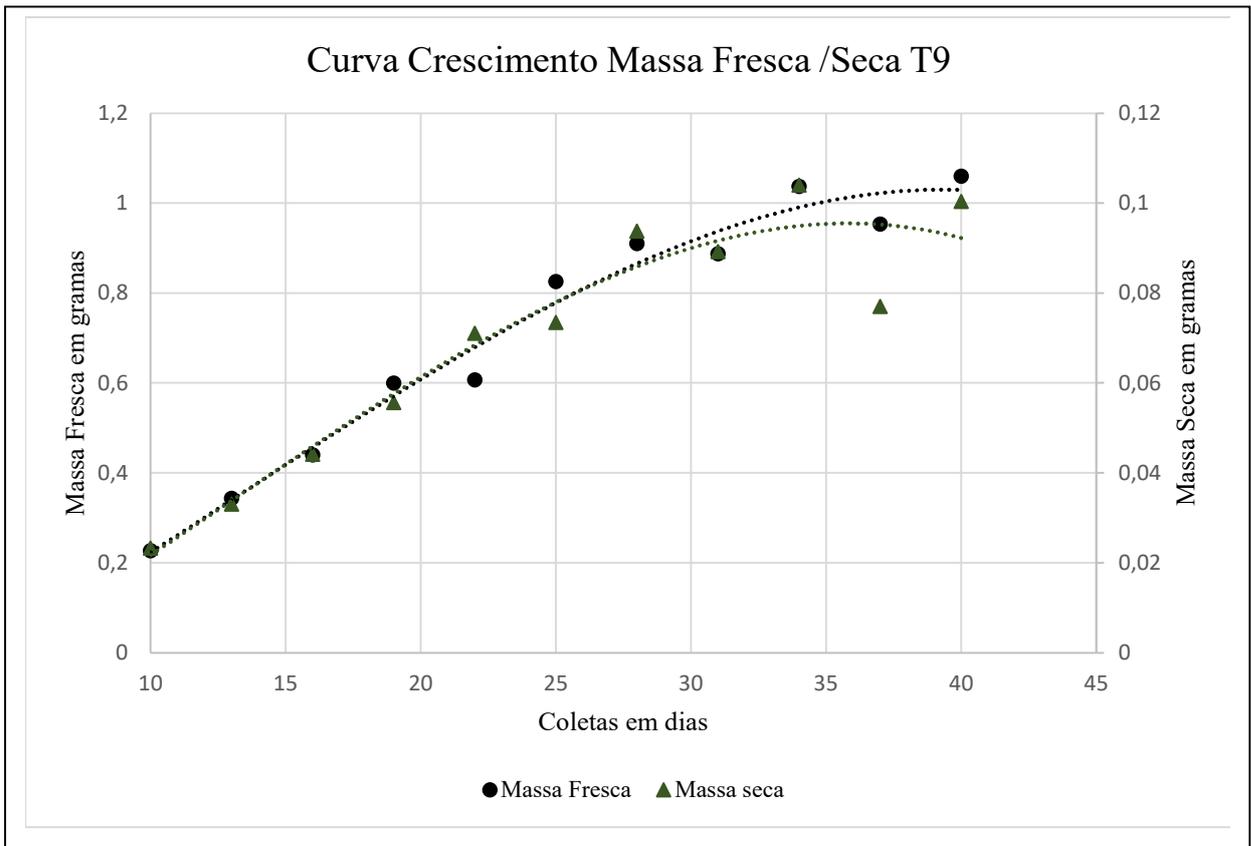
**Figura 18** – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D.

As curvas de crescimento de massa fresca e massa seca obtidas com o meio MS meio suplementado com 0,25 mg/l BAP e 1,0 mg/l 2,4-D (Figura 19), apresentaram a fase lag entre o décimo e o décimo terceiro dia, a fase exponencial do décimo quarto ao décimo nono dia, a fase linear ocorreu do vigésimo ao vigésimo sétimo dia, a fase de desaceleração foi observada do vigésimo oitavo ao trigésimo primeiro dia, do trigésimo segundo ao trigésimo sétimo a fase estacionária. O aumento da massa fresca ocorreu do décimo terceiro dia ao vigésimo sétimo dia, em comparação aos outros tratamentos é o que apresenta a menor fase de incremento de massa fresca. No período preconizado pela literatura (em torno de 21 dias) os calos estavam no início da fase linear e apresentou a massa de 0,3990 g o que é 4,9 vezes mais que a massa inicial e uma taxa de crescimento de aproximadamente 75% (Figura 22).

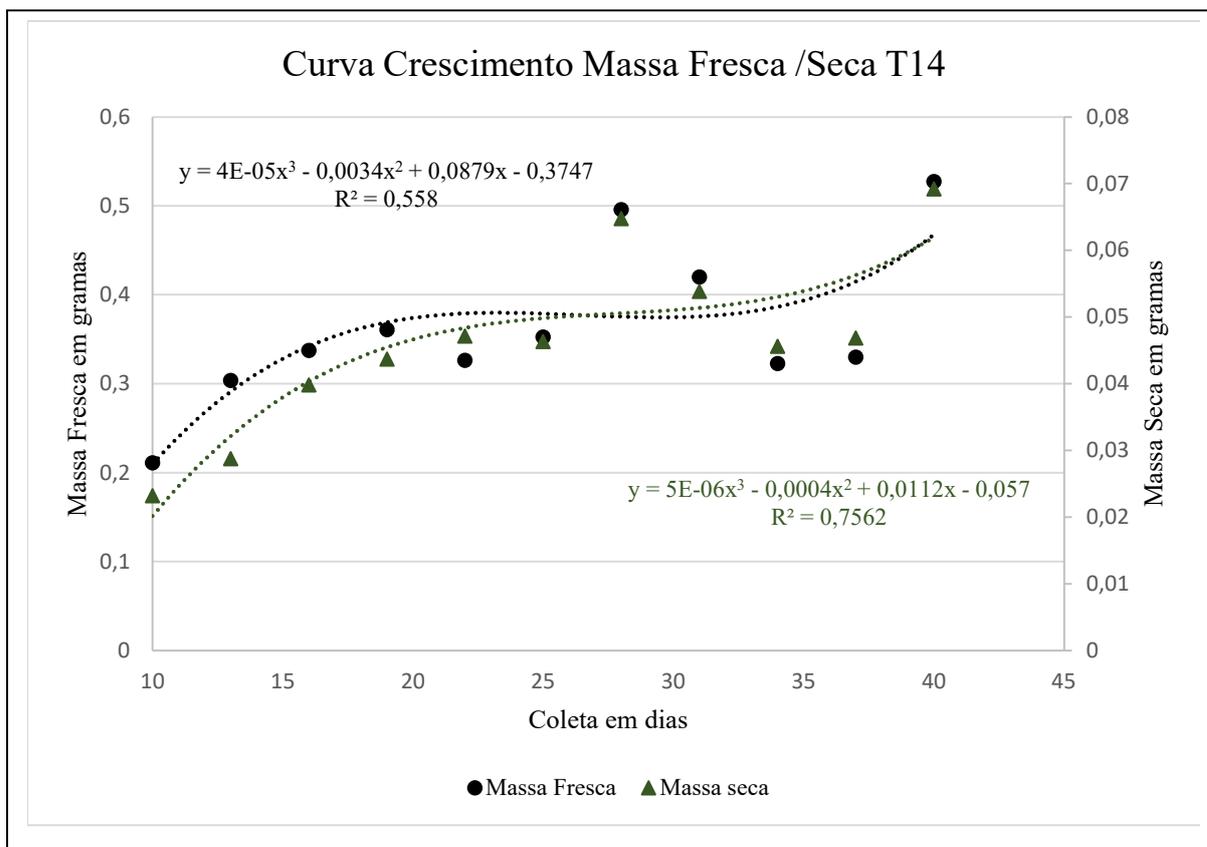


**Figura 19** – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L 2,4-D.

As curvas de crescimento de massa fresca e massa seca obtidas com o meio MS suplementado com 0,25 mg/L BAP e 2,0 mg/L 2,4-D (Figura 20), apresentaram a fase exponencial do décimo ao décimo sétimo dia, a fase linear ocorreu do décimo oitavo ao vigésimo oitavo dia, fase de desaceleração foi observada do vigésimo nono ao trigésimo quarto dia e a fase estacionária a partir do trigésimo quinto dia. O aumento da massa fresca ocorreu do décimo dia ao vigésimo oitavo dia. No período preconizado pela literatura (em torno de 21 dias) os calos estavam no início da fase linear e apresentou a massa de 0,6516 g o que é 8,1 vezes mais que a massa inicial e uma taxa de crescimento de aproximadamente 86% (Figura 22).



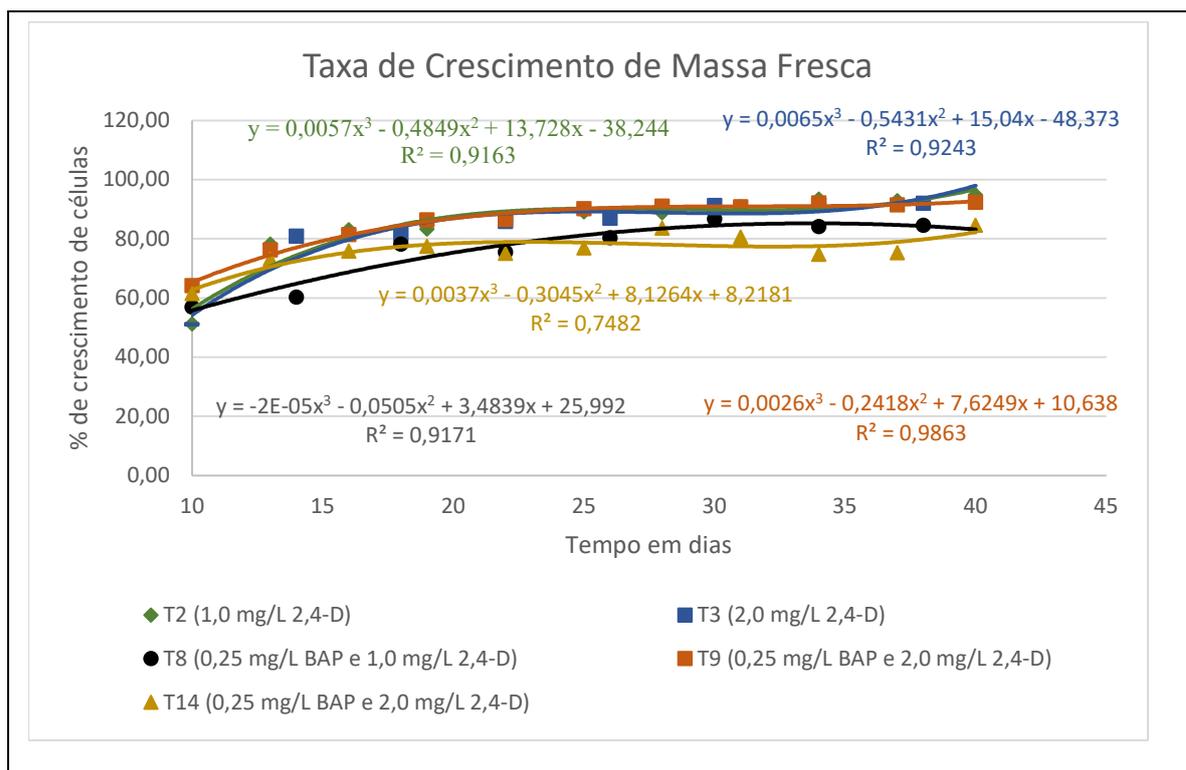
**Figura 20** – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com 0,25 mg/L BAP e 2,0 mg/L 2,4-D.



**Figura 21** – Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L ANA.

As curvas de crescimento de massa fresca e massa seca obtidas com o meio MS suplementado com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L ANA (Figura 21), apresentaram a fase exponencial do décimo ao décimo oitavo dia, a fase linear ocorreu do décimo nono ao trigésimo sexto dia e a fase de desaceleração foi observada a partir do trigésimo sétimo dia. O aumento da massa fresca ocorreu do décimo dia ao trigésimo sexto dia. No período preconizado pela literatura (em torno de 21 dias) os calos estavam no início da fase linear e apresentou a massa de 0,3422 g o que é 4,3 vezes mais que a massa inicial e uma taxa de crescimento de aproximadamente 75% (Figura 22).

O tratamento onde ocorreu o menor acúmulo de massa fresca e massa seca foi o com 0,25 mg/L BAP e 1,0 mg/L ANA (T14), enquanto nos tratamentos com 1,0 mg/L 2,4-D (T2) e com 0,25 mg/L BAP e 2,0 mg/L 2,4-D (T9) apresentaram os maiores valores de massa fresca e massa seca.



**Figura 22** – Curva da taxa de crescimento porcentual de calos formados a partir de explantes de cotilédones, inoculados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.

O tratamento T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) foi o único onde foi possível graficamente observar as seis fases. Nos tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) e T 14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA) não foi observada a fase Lag. Rajaram et al., (2013) em cultura de calos com explante de folha, caule e raiz em *Tephrosia tinctoria* utilizando as mesmas concentrações de 2,4-D observou que o processo de desdiferenciação levou de oito a dez dias após a inoculação que foi semelhante ao intervalo de tempo que levou para realização da primeira pesagem. A fase Lag corresponde ao período em que as células do explante passam pelo processo de organização para dar início ao processo de divisão celular e produção de energia.

O tratamento T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) foi o único que apresentou a fase de estabilização alguns autores definem esta fase como a que pode ocorrer o acúmulo de metabólitos secundários (NOGUEIRA *et al.*, 2008). O tratamento T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) foi o que apresentou a fase de crescimento exponencial com o menor prazo de duração, cerca de 5 dias. Nos tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) e 0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA esta fase teve duração média de 8 dias. Esta fase é definida como a fase onde ocorre alta taxa de divisão celular (STEIN *et al.*, 2010).

O tratamento T 14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA) foi o que apresentou a maior fase linear com cerca de 18 dias de duração. Os tratamentos T8 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D) e T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) tiveram 8 e 11 dias de duração respectivamente. Enquanto T2 (1,0 mg/L de 2,4-D) e T3 (2,0 mg/L de 2,4-D) apresentaram em média 15 dias de duração. Esta fase é caracterizada pela ocorrência da diminuição da divisão celular e aumento da área celular (SANTOS *et al.*, 2008). Nos tratamentos T2 (1,0 mg/L de 2,4-D), T3 (2,0 mg/L de 2,4-D), T9 (0,25 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D) e T 14 (0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de ANA) foi observado graficamente até a fase de desaceleração.

Nota-se que o incremento de massa ao explante nos tratamentos T2, T3 e T9 ocorreu de forma mais acentuada do que nos tratamento T8 e T14. Permitindo assim estabelecer uma relação entre os reguladores de crescimento e o desenvolvimento do explante. Os tratamentos em que existe a presença

da auxina 2,4-D apresentaram melhor formação de calos do que quando usado a auxina ANA. Na presença da auxina 2,4-D isolada foi observado que o processo de oxidação ocorreu de forma mais acelerada. Enquanto nos calos onde foi utilizada a adição ao meio de 2,4-D em associação com BAP este processo levou um tempo maior para ser observado. Isso se deve a citocinina BAP que atua nos processos celulares de senescência de tecidos e órgãos vegetais desacelerando os efeitos fisiológicos degenerativos (MORAES *et al.*, 2014)

### 4.3 Avaliação dos teores de rotenona e deguelina nas massas de calos de em *Tephrosia vogelii* considerando diferentes tratamentos para indução de calos

Calos obtidos após três recultivos foram avaliados quanto as suas características qualitativas no tocante a intensidade de formação e densidade dos calos formados (Figura 23 a 27).

A cada 21 dias foram coletados 24 calos de cada tratamento e estes foram macerados com nitrogênio líquido e analisados por cromatografia para determinação das concentrações de rotenona e deguelina. A tabela 05 representa os tratamentos realizados frente aos efeitos observados de crescimento na inicialização de calos em explante de cotilédone.

**Tabela 05** - Efeito dos reguladores de crescimento na inicialização de calos em explante de cotilédone avaliados aos 21 dias.

Tratamento	Regulador de Crescimento mg/L			Intensidade de Formação <sup>a</sup>	Coloração do Calo <sup>b</sup>	Densidade do calo <sup>c</sup>
	ANA	2,4-D	BAP			
2	-	1,0	-	+++	AM/MR/BR	F
3	-	2,0	-	+++	VC/AM/MR/BR	F
8	-	1,0	0,25	+++	VC/VE/MR/BR	F/ C
9	-	2,0	0,25	+++	VC/VE/AM/MR/BR	F/ C
14	1,0	-	0,25	++	MR/BR	C

<sup>a</sup>Avaliação da formação dos calos conforme sua presença/ausência de brotos na extensão. Intumescimento: inchaço com aumento de volume sem emissão de calo; (+): intumescimento do explante com a emissão de pequenos brotos; (++) : emissão moderada de calos correspondendo a aproximadamente ½ da região exposta do explante; (+++): a emissão em toda da área exposta do explante.

<sup>b</sup>Avaliação da coloração: BR- Branco, AM- amarelo, VC- verde claro, VE- verde escuro e Marrom.

<sup>c</sup>Avaliação de densidade: C- compacto e F- friável.

Os calos submetidos as concentrações de 1,0 e 2,0 mg/L da auxina 2,4-D apresentaram uma conformação homogênea, com densidade friável e com coloração inicial verde claro evoluindo para amarelo com regiões marrons e brancas (Figuras 23 e 24) ratificando observações previas desta pesquisa. A intensidade de formação (+++) em ambos, porém ocorreu em mais explantes quando considerada a concentração de 2,0 mg/mL de 2,4D comparada a concentração de 1,0 mg/mL de 2,4D, como observado na Figura 27.



**Figura 23** – Calos formados a partir de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* inoculados em meio MS suplementado com a auxina 2,4-D na concentração de 1,0 mg/mL avaliado aos 21 dias. (Acervo do autor).



**Figura 24** - Calos formados a partir de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* inoculados em meio MS suplementado com a auxina 2,4-D na concentração de 2,0 mg/L avaliado aos 21 dias (Acervo do autor).

Os calos obtidos da combinação da auxina 2,4-D com a citocinina BAP apresentaram aspecto de formação de calos heterogênea de calos. Com brotações de diferentes densidades e colorações. As colorações verde escuro e branca com densidade compacta e as verde claro e amarelo as friáveis (Figura 25 e 26). Com a realização do recultivo alguns calos passavam a obter coloração marrom. O tratamento com a concentração de 2,0 mg/mL de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP apresentaram um número maior de explantes com intensidade de formação (+++) em relação ao tratamento com 1,0 mg/mL de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (Figura 24). A concentração de 2,0 mg/mL de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP apresentou o maior número de explantes com brotações friáveis (Figura 25).



**Figura 25** - Calos formados a partir de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* inoculados em meio MS suplementado com a auxina 2,4-D na concentração de 1,0 mg/mL e a citocinina BAP na concentração 0,25 mg/L avaliado aos 21 dias (Acervo do autor).

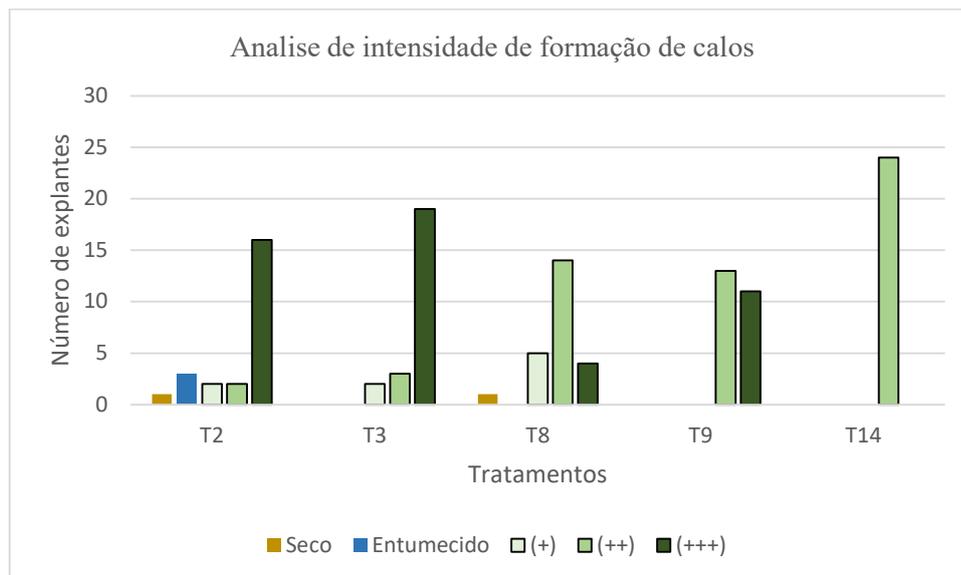


**Figura 26** - Calos formados a partir de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* inoculados em meio MS suplementado com a auxina 2,4-D na concentração de 2,0 mg/mL e a citocinina BAP na concentração 0,25 mg/L avaliado aos 21 dias (Acervo do autor).

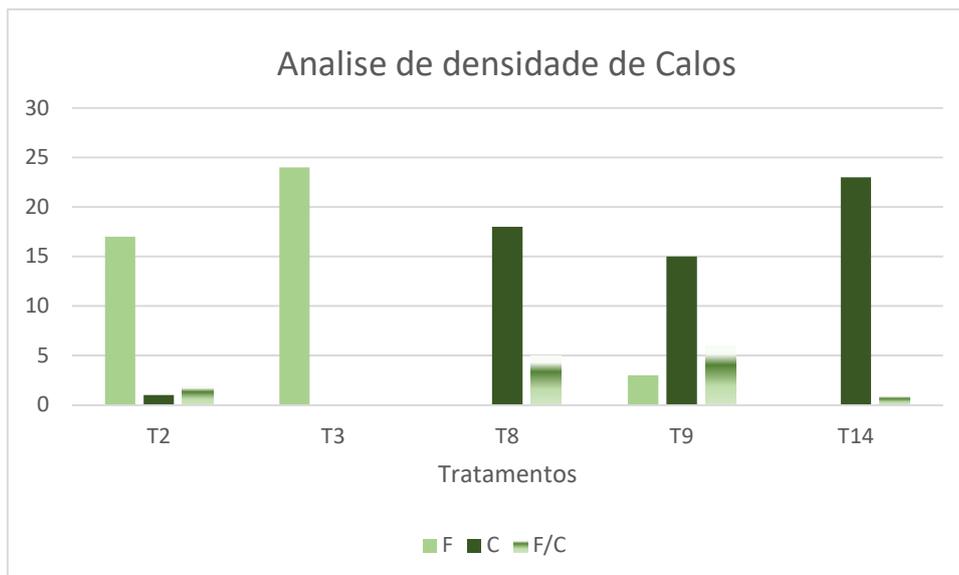
A combinação entre a auxina ANA na concentração de 1,0 mg/L e a citocinina BAP na concentração 0,25 mg/L foi a que apresentou o desempenho para indução de calos mais baixo apresentando brotações verde escuro e marrom de densidade compacta ao longo de todo explante (Figura 26). Enquanto nos outros tratamentos os calos tinham proporções maiores neste tratamento com as passagens ocorreu o aparecimento de raízes e pequenas folhas indicando a ocorrência dos calos em tecidos especializados. Porém, Ranjitha *et al.*, (2018) obteve indução de calos (+++) verde friável utilizando a combinação de ANA e BAP em diferentes concentrações na coloração verde e friáveis enquanto no tratamento aplicado neste trabalho a intensidade de formação foi (++) e os calos na maioria dos explante eram compactos (Figura 27).



**Figura 27** - Calos formados a partir de explante de cotilédone de *Tephrosia vogelii* inoculados em meio MS suplementado com a auxina ANA na concentração de 1,0 mg/L e a citocinina BAP na concentração 0,25 mg/L avaliado aos 21 dias (Acervo do autor).

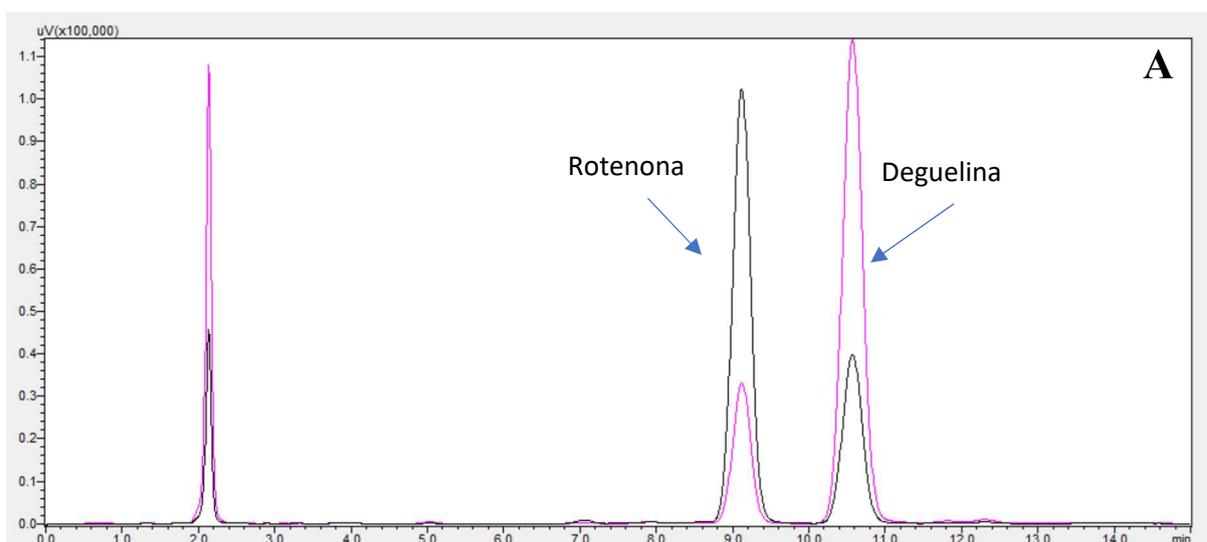


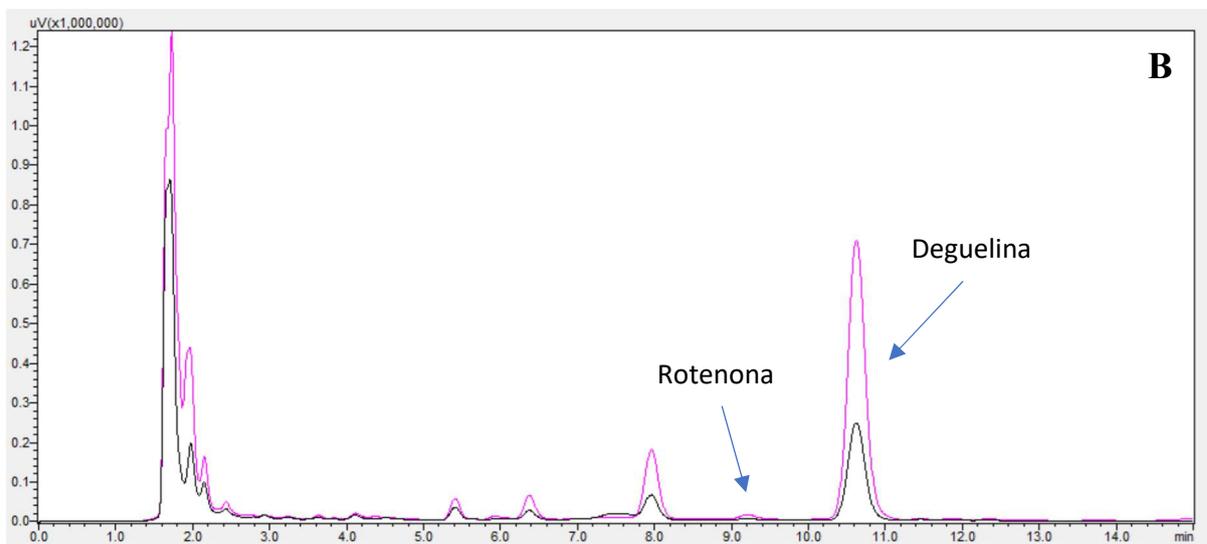
**Figura 28** – Intensidade de formação dos calos em cada coleta de cada tratamento no processo de indução de calos de *Tephrosia vogelii* em meio MS suplementado com os reguladores de crescimento 1,0 mg/mL de 2,4-D no Tratamento 2, 2,0 mg/L de 2,4-D no Tratamento 3, 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 8, 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 9, 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 14 avaliado aos 21 dias.



**Figura 29** - Densidade de formação dos calos em cada coleta de cada tratamento no processo de indução de calos de *Tephrosia vogelii* em meio MS suplementado com os reguladores de crescimento 1,0 mg/mL de 2,4-D no Tratamento 2, 2,0 mg/mL de 2,4-D no Tratamento 3, 1,0 mg/mL de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 8, 2,0 mg/mL de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 9, 1,0 mg/mL de ANA e 0,25 mg/L de BAP no Tratamento 14 avaliado aos 21 dias.

O perfil cromatográfico dos extratos dos picos apresentou boa separação entre os picos da rotenona e da deguelina. A rotenona saiu no tempo de retenção de 9.20 minutos e com o  $\lambda$  máximo em 293 nm e a deguelina saiu no tempo de retenção de 10.50 minutos com o  $\lambda$  máximo em 270 nm na amostra controle fortificada com padrão de referência. As amostras apresentaram tempos de retenção semelhantes ao determinado na solução padrão (Figura 30).





**Figura 30** – Perfis cromatográficos (A) de amostra controle fortificada com padrão de referência de rotenona e deguelina na concentração de 50 µg/mL e no cromatograma (B) extrato metanólico de calos de *Tephrosia vogelii*. (Fonte: Dados do experimento)

A análise por CLAE-UV dos extratos metanólicos de calos macerados crescidos em meio MS suplementados com 1,0 mg/L de 2,4-D (T02), 2,0 mg/L de 2,4-D (T03), 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T08), 2,0 mg/mL 2,4-D e 0,25 mg/L BAP (T09), 1,0 mg/mL ANA e 0,25 mg/L BAP (T14) e a amostra composta de cotilédones (coletada no dia da inoculação) macerados demonstraram na análise cromatográfica a presença de rotenona e deguelina nos materiais crescidos aos 21, 42 e 63 dias. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6 para deguelina e na tabela 7 para a rotenona.

**Tabela 06** – Análise da concentração de deguelina em extrato metanólico de calos macerados, obtidos do cultivo em meio MS suplementados com 1,0 mg/L de 2,4-D, 2,0 mg/L de 2,4-D, 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP, 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP, 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP e cotilédones coletados no dia da inoculação sem entrar em contato com o meio. As coletas ocorreram com 21 dias (1º Coleta), 42 (2º Coleta) e 63 dias (3º Coleta)

	Tratamento	Concentração de deguelina em nmol/g de matéria fresca		
		1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta
2	1,0 mg/L de 2,4-D	215,0 (bc)	100,7 (b)	81,4 (c)
3	2,0 mg/L de 2,4-D	107,1 (c)	83 (b)	59,7 (c)
8	1,0 mg/L de 2,4-D + 0,25 mg/L de BAP	337,0 (b)	315,2 (ab)	450 (b)
9	2,0 mg/L de 2,4-D + 0,25 mg/L de BAP	203,6 (bc)	175,7 (ab)	138,9 (bc)
14	1,0 mg/L de ANA + 0,25 mg/L de BAP	1107,9 (a)	991,8 (a)	1248,7 (a)
	Cotilédone sem ser inoculado	377,2 (b)	377,2 (ab)	377,2 (bc)
	CV (%)	21,21	93,1	32,9
	DMS	227,74	869,4	354,3

**Tabela 07** - Análise da concentração de rotenona em extrato metanólico de calos macerados, crescidos em meio MS suplementados com 1,0 mg/L de 2,4-D, 2,0 mg/L de 2,4-D, 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP, 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP, 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP e cotilédones coletados no dia da inoculação sem entrar em contato com o meio. As coletas ocorreram com 21 dias (1º Coleta), 42 (2º Coleta) e 63 dias (3º Coleta)

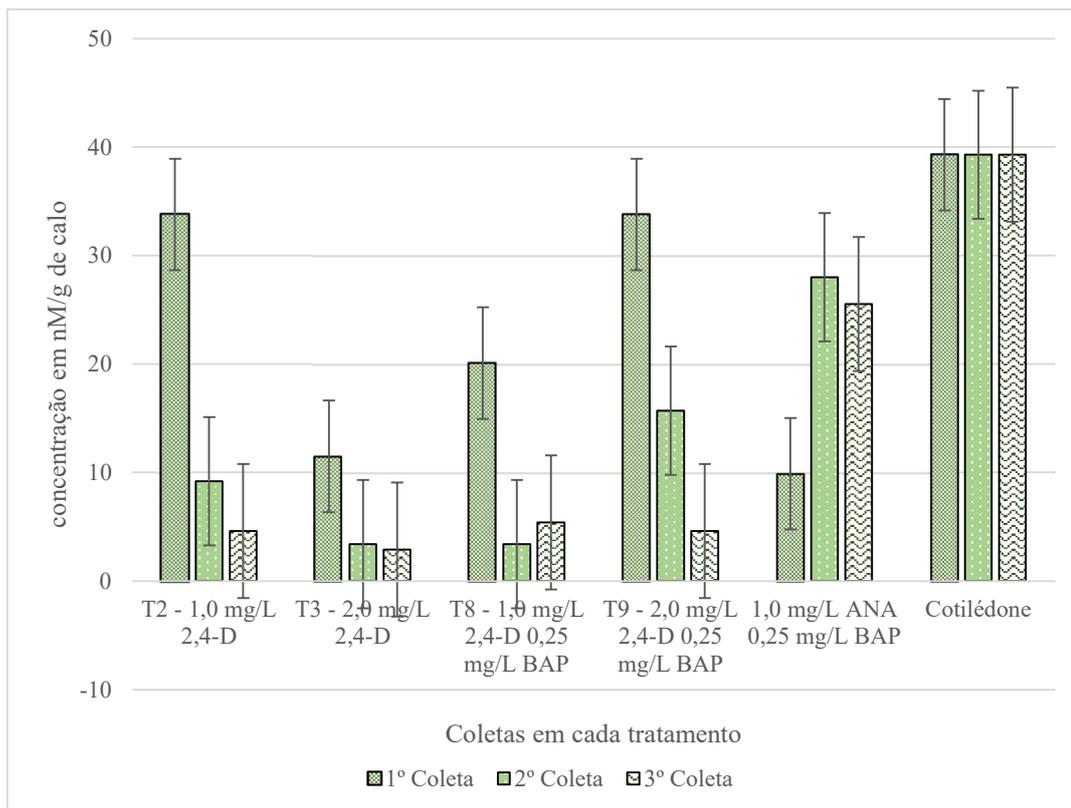
<b>Concentração de rotenona em nmol/g de matéria fresca</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>1º Coleta</b>	<b>2º Coleta</b>	<b>3º Coleta</b>
<b>2</b> 1,0 mg/L de 2,4-D	33,8 (a)	9,2 (a)	4,6 (a)
<b>3</b> 2,0 mg/L de 2,4-D	11,5 (a)	3,4 (a)	2,9 (a)
<b>8</b> 1,0 mg/L de 2,4-D + 0,25 mg/L de BAP	20,1 (a)	3,4 (a)	5,4 (a)
<b>9</b> 2,0 mg/L de 2,4-D + 0,25 mg/L de BAP	33,8 (a)	15,7 (ab)	4,6 (a)
<b>14</b> 1,0 mg/L de ANA + 0,25 mg/L de BAP	9,9 (a)	28 (bc)	25,53 (b)
Cotilédone sem ser inoculado	39,3 (a)	39,3 (c)	39,3 (c)
<b>DMS</b>	57,9	29,9	31,9
<b>CV (%)</b>	39,2	13,5	12,0

\*Valores acompanhados de mesma letra em uma mesma coluna, não apresentam variação estatística entre si pelo teste de Tuckey

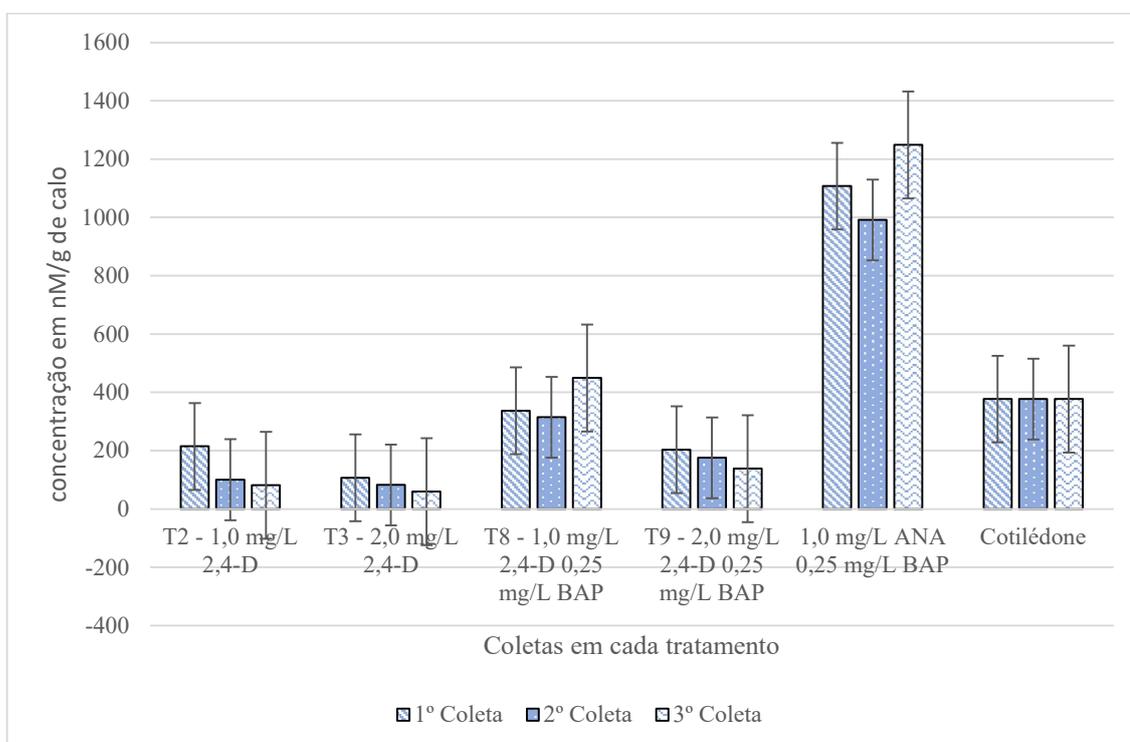
Com base nos resultados pode-se inferir que a grande variabilidade nas concentrações de rotenona e deguelina durante o desenvolvimento dos calos, o que evidencia ser esta uma rota metabólica influenciada pela concentração e tipo de hormônio, bem como incidência de luz. Lambert *et al.*, (1993) em testes com calos cultivado na presença e na ausência de luz também observou a influência na produção destes metabólitos. Para Souza *et al.*, (2015) a composição do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento, tem efeitos profundos sobre a resposta do explante nas diferentes fases do cultivo “in vitro”, sendo estes um dos responsáveis pelas rotas metabólicas que ocorrerão no calo em meio de cultura.

As concentrações determinadas de deguelina foram significativamente maiores que as de rotenona nas amostras. A menor concentração de deguelina encontrada foi de 59,7 nM/g no material crescido no tratamento com 2,0 mg/L de 2,4-D na 3º Coleta realizada aos 63 dias e a maior concentração encontrada foi de 1248,7 nM/g de calo no tratamento com 1,0 mg/L de ANA 0,25 mg/L de BAP na 3º Coleta, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Para rotenona a menor concentração de deguelina encontrada foi de 2,9 nM/g de calo no tratamento com 2,0 mg/L de 2,4-D na 3º Coleta e a maior concentração encontrada foi de 33,8 nM/g de calo nos tratamentos com 1,0 mg/L de 2,4-D e com 2,0 mg/L de 2,4-D 0,25 mg/L de BAP na 1º coleta (tabelas 6 e 7).

A amostra de cotilédones não inoculados apresentou uma concentração de deguelina de 377,2 nM/g e uma concentração de rotenona de 39,3 nM/g. Lambert *et al.*, (1993) em cultura de calos de *Tephrosia vogelii*, com explante de hipocótilo, crescidas na presença de luz em meio MS suplementado com ANA e BAP identificaram uma maior concentração de rotenona em relação a deguelina. Os mesmos autores utilizando extratos de folhas identificaram como rotenóide majoritário a deguelina. A identificação de deguelina como composto majoritário em extrato de folha também foi observada em *Tephrosia vogelii* em um dos quimiotipos estudados por Setevenson *et al* (2012)



**Figura 31** - Ocorrência de rotenona em calos com 21, 42 e 63 dias de cultivo em diferentes meios de cultura de calos de *Tephrosia vogelii*



**Figura 32** - Ocorrência de deguelina em calos com 21, 42 e 63 dias de cultivo em diferentes meios de cultura de calos de *Tephrosia vogelii*

Nos tratamentos onde foram empregados 1,0 mg/L de 2,4-D (T2), 2,0 mg/L de 2,4-D (T3) e 2,0 mg/L 2,4-D de 0,25 mg/L BAP (T9) foram observadas a maior concentração de rotenona e deguelina em quatro semanas após a inoculação diminuindo em 42 semanas e posteriormente em 63 semanas. A produção de rotenóides em *Tephrosia vogelii*, relatada por Sharma e Khanna 1975, a partir de culturas de tecidos de calos e células culturas de suspensão em meio MS suplementado com 2,4-D apresentaram teores máximos de rotenona após quatro semanas de cultivo e diminuindo gradualmente em tecidos com 6 e 8 semanas de cultivo. A diminuição gradual dos conteúdos dos rotenóides com a passagem das subculturas de calos de *Lablab purpureus* também foi observada por Kamal, (2012) e em subculturas de calos de *Crotalaria burhia* por Uddin, (1979).

O extrato de calo crescido em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D 0,25 mg/L de BAP (T8) apresentou como rotenóide majoritário a deguelina sendo a concentração máxima encontrado na avaliação aos 63 dias de subcultivo (3º Coleta). Para a rotenona a concentração máxima encontrada foi aos 21 dias e aos 42 dias de cultivo.

O extrato de calo crescido em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de ANA 0,25 mg/L de BAP (T14) apresentou como rotenoide majoritário a deguelina sendo a concentração máxima aos 63 dias de subcultivo (3º Coleta). No tocante a rotenona, a concentração máxima encontrada foi aos 42 dias (2º coleta), seguida da concentração encontrada aos 63 dias (3º Coleta) de subcultivo. Conceição *et al.*, (2006) trabalhando com explante foliar em com meio MS, suplementado com 2,0 mg/L de ANA + 2,0 mg/L de BAP não conseguiu identificar a presença de rotenóides em *Derris urucu*.

A relação entre os tratamentos e a concentração encontrada dos analitos foi em ordem decrescente para deguelina foi 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP (T14) > 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T8) > 1,0 mg/L de 2,4-D (T2) > 2,0 mg/L de 2,4-D 0,25 mg/L de BAP (T9) > 2,0 mg/L de 2,4-D (T3). Para a rotenona a relação entre as concentrações foram 1,0 mg/L de 2,4-D (T2) > 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T9) > 1,0 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de BAP (14) > 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de BAP (T8) > 2,0 mg/L de 2,4-D (T3).

Resultados obtidos neste estudo, demonstram que calos mais friáveis oriundos dos tratamentos T02 e T03 onde utilizou-se apenas dosagens da auxina 2,4-D (Figuras 31 e 32), resultaram em concentrações menores de deguelina quando comparados aos calos mais compactos (Tratamento T14). Tal situação foi observada nos três recultivos, podendo este fato estar associado a concentrações residuais do explante no material analisado.

No tocante as concentrações de rotenona, constata-se que nos primeiros 21 dias de cultivo, o uso do hormônio 2,4-D favoreceu a biossíntese deste rotenoide. Com o passar do tempo e realização dos recultivos, constatou-se que a concentração de rotenona diminuiu, podendo esta resposta estar associada a presença de maior número de células desdiferenciadas e com menor efeito do material do explante original. Apenas no tratamento T14 com o uso da auxina ANA é possível verificar concentrações maiores de rotenona e deguelina aos 42 e 63 dias de recultivo, indicando um favorecimento do acúmulo deste rotenóide em células com o passar do tempo. Entretanto é preciso considerar o pontuado por Kamal *et al.* (1993) que verificaram o fato de que culturas de calos podem ter um potencial de biossíntese ligado ao metabolismo secundário maior do que partes das plantas que sejam fontes naturais de rotenoides.

Os resultados demonstram a influência das condições do meio de cultura na regulação da produção de metabólitos secundários. Parece que a concentração dos reguladores de crescimento e a combinações entre os reguladores de crescimento papel importante para observação na variação da concentração de rotenona e deguelina. Sendo já bem descrito na literatura que múltiplos fatores podem ser responsáveis pela regulação da produção destes metabólitos, sendo descrita a fenilalaninamonialiasse (PAL) um dos pontos de regulação da produção de rotenoides (BOLWELL *et al.*, 1985; CROMBIE, 1984, LAMBERT *et al.*, 1998).

O processo de desdiferenciação celular está ligado a via metabólica que estará mais ativa na célula o que é um fator determinante para a concentração dos metabólitos secundários encontrados nos resultados. Onde foi observado na maioria dos tratamentos o decaimento das concentrações ao longo do tempo. Excetuando o tratamento com a auxina ANA e a citocinina BAP onde foi observado o aumento

da concentração ao longo do tempo (Figura 31 e 32). Embora a variação das concentrações demonstre relação com o regulador de crescimento utilizado e sua concentração a manipulação de outras condições podem ser realizadas. Como por exemplo a adição de elicitores químicos ou a manipulação de elicitores físicos, que podem ser levadas em consideração para otimizar a produção de rotenona e deguelina. Mantendo dessa forma a produção ao longo do tempo mais constante (LAMBERT et al, 1998).

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições de desenvolvimento deste estudo foi possível verificar que o uso da auxina 2,4-D nas concentrações de 1,0 mg/L e 2,0 mg/L empregados de forma isolada ou em associação com a citocinina BAP na concentração de 0,25 mg/L favoreceram o estabelecimento de calos friáveis a partir de explantes de cotilédones.

O emprego da de auxina 2,4-D na concentração de 2,0 mg/L aliada ao uso da citocinina BAP na concentração de 0,25 mg/L permitiu uma taxa de crescimento celular mais acelerada com concentrações de rotenona de 33,8 nmol/g de matéria fresca aos 21 dias.

Houve diminuição nas concentrações de rotenona avaliadas em calos *Tephrosia vogelii* aos 21, 42 e 63 dias para todos os tratamentos com o uso do 2,4-D como auxina. Concentrações de deguelina foram maiores ao serem empregados os reguladores de crescimento ANA e BAP nas concentrações de 1,0 mg/L e 0,25 mg/L, respectivamente. Todavia, os calos obtidos foram pequenos e não friáveis, podendo evidenciar efeito residual do explante utilizado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELMAIN, S. R., Amoah, B. A., Nyirenda, S. P., Kamanula, J. F., & Stevenson, P. C. Highly variable insect control efficacy of *Tephrosia vogelii* chemotypes. **Journal of agricultural and food chemistry**, 60(40), 10055-10063, 2012.

BUSHWAY, Rodney J. Modification of liquid chromatographic method for analysis of rotenone formulations. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, n. 3, p. 490-491, 1984.

BOLWELL, G. P., Bell, J. N., Cramer, C. L., Schuch, W., Lamb, C. J., & Dixon, R. A. l-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: Characterisation and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. **European Journal of Biochemistry**, v. 149, n. 2, p. 411-419, 1985.

CHEN, Yinning, Yan, T., Gao, C., Cao, W., & Huang, R. Natural products from the genus *Tephrosia*. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1432-1458, 2014.

DA COSTA, Danielle et al. Using LC and Hierarchical Cluster Analysis as Tools to Distinguish Timbó Collections into Two *Deguelia* Species: A Contribution to Chemotaxonomy. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 569, 2016.

DA CONCEIÇÃO, H. E. O., Pinto, J. E. B. P., Viégas, I. D. J. M., Frazão, D. A. C., de Quadros, B. R., & da Silva Ripardo, A. K. Nutrição Mineral e Detecção de Rotenoides Durante a Manutenção de Calos de Timbó Vermelho. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, n. 45, p. 205-214, 2006.

DE MELO, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. In: Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Seminário Coda de Nutrição Vegetal, 1., 2002, Petrolina. **Anais...** Petrolina: CODA, 2002., 2002.

DO BRASIL, Flora. em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FAGAN, E. B., Ono, E. O., Rodrigues, J. D., Chalfun Júnior, A., & Dourado Neto, D. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. 1. ed. São Paulo: Andrei Editora, 2015.

FEITOSA, L., S. Influência de reguladores de crescimento no estabelecimento in vitro e indução de calos em pinhão-mansão. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Sergipe, 2011.

IRVINE, James E.; Freyre, Ruben H. Source materials for rotenone, occurrence of rotenoids in some species of the genus *Tephrosia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 106-107, 1959.

ILLG, Rolf Dieter. Plant tissue culture techniques. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 21-24, 1991.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides in the twenty-first century—Fulfilling their promise? **Annu. Rev. Entomol.** 65:233–249, 2020.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

- GEORGE, Edwin F. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. **The technology**, 1993.
- GONÇALVES JÚNIOR, M., Silva, A. D. B., Cordeiro, A. D. S., Guerra, J., Espindola, J., & Araujo, E. D. S. (2012). Crescimento da leguminosa arbustiva *Tephrosia vogelii* em sistema orgânico de produção. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (86). Embrapa Agrobiologia, 2012. 24 p.
- RODRIGUES, J. D.; Fioreze, S. L. Reguladores são, para muitos cultivos, indispensáveis ao alcance de bons níveis. **Visão Agrícola**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2015.
- KODAMA, Tohru; Yamakawa, Takashi; Minoda, Yasuji. Rotenoid biosynthesis by tissue culture of *Derris elliptica*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 2387-2390, 1980.
- KAMAL, R.; Mangla, M. In vivo and in vitro investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Biosciences** 18, 93–101, 1993.
- KAMAL, R; MATHUR, N. In vitro regulation of rotenoid biosynthesis from *lablab purpureus* L. **Applied Biology**, 48, 9685-9689, 2012.
- KARIUKI, D. K.; NJIRU, S. N. Spectrophotometric evaluation of rotenone extraction from leaves and seeds of mature *Tephrosia vogelii* plant. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 50-53, 2018.
- KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- LAMBERT, N. T., M. F., Nef-Campa, C., & Chrestin, H. Production of rotenoids by heterotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1515-1520, 1993.
- LAMBERT, N.; TROUSLOT, M.-F.; CHRESTIN, H. *Tephrosia vogelii* Hook f.: In Vitro Culture, and the Production of Rotenoids and Other Secondary Metabolites. In: **Medicinal and Aromatic Plants X**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1998. p. 443-455.
- CROMBIE, L. Rotenoids and their Biosynthesis. **Natural Product Reports**. Vol.1, pp 3-19, 1984.
- LAMEIRA, Osmar Alves Lameira, O. A., Lemos, O. F., de MENEZES, I. C., & Pinto, J. E. B. P. Cultura de tecidos. **Manual**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66) 2000.
- LAMEIRA, Osmar Alves. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Lavras, 1997.
- MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiologia**, 2005.
- MKINDI, A. G.; Tembo, Y., Mbega, E. R., Medvecky, B., Kendal-Smith, A., Farrell, I. W., ... & Stevenson, P. C. Phytochemical analysis of *Tephrosia vogelii* across East Africa reveals three chemotypes that influence its use as a pesticidal plant. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 597, 2019.
- MURASHIG, T.; SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- MORAIS, T. P., Luz, J. M. Q., Silva, S. M., Resende, R. F., & Silva, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo in vitro de Mentha x Piperita L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 350-355, 2014.

MUJEEB, M., Zafar, R., Husain, A., & Ahmad, A. Antihepatotoxic activity of aqueous extracts of callus culture of *Tephrosia purpurea* (L) pers. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, 9, 55-549, 2012.

NOGUEIRA, R. C., Paiva, R., Lima, E. C., Soares, G. A., Oliveira, L. M., Santos, B. R., ... & Castro, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

OGENDO, J. O., Belmain, S. R., Deng, A. L., & Walker, D. J. Comparison of toxic and repellent effects of *Lantana camara* L. with *Tephrosia vogelii* Hook and a synthetic pesticide against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize grain. **International Journal of tropical insect science**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2003.

PAIVA, R.; Paiva, P de O. **Cultura de Tecidos**. 1 ed, Lavras (MG): UFLA/FAEPE Editora, 2001.

QUISEN, R. C.; ÂNGELO, PC da S. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. **Manual**. Embrapa Amazônia Ocidental-Documents (INFOTECA-E), 2008.

RAJARAM, K; Moushmi, M., Velayutham Dass Prakash, M., Kumpati, P., Ganasaraswathi, M., & Sureshkumar, P. Comparative bioactive studies between wild plant and callus culture of *Tephrosia tinctoria* pers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 2105-2120, 2013.

RANJITHA V., Kalimuthu K., Vajjiram Chinnadurai and A. Vanitha. In vitro Seed Germination, Callus Induction and Regeneration of *Tephrosia villosa* (L.) Pers - An Important Ethanomedicinal Plant. **International Journal Scientific Research Review**. 7(3), 1903-1914, 2018.

ROSSATO, Marieli et al. Propagação in vitro e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Jataí, 2015.

SANDVIK, M., Waaler, T. A., Rundberget, T., Adolfsen, P., Bardal, H., & Sandodden, R. Fast and accurate on-site determination of rotenone in water during fish control treatments using liquid chromatography. **Management of Biological Invasions**. Volume 9, Issue 1: 59–65, 2018.

SANTOS, M. R. A; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 133-136, 2010.

SANTOS, C. G.; PAIVA, E.; PAIVA, PD de O. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. Embrapa Milho e Sorgo-**Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2008.

SAMUEL, V. J; Mahesh A. R., Murugan V. Phytochemical and pharmacological aspects of *Tephrosia* genus: A brief review. **J Appl Pharm Sci**, 2019; 9(03):117–125.

SARIN, R. Useful metabolites from plant tissue cultures. **Biotechnology**. 4 (2), 79-93, 2005.

SHARMA R, Khanna P (1975) Production of rotenoids from *Tephrosia* spp. In vivo and in vivo tissue cultures. **Indian J Exp Bioi** 13:84-85.

SKOOG, D. A.; Holler, F. J., & Nieman, T. A. **Principles of instrumental Analysis**. 5 ed, Thomson Editora, 2008.

SOUZA, Julio Cezar de; RESCAROLLI, Cristine Luciana de Souza; NUNEZ, Cecília Verônica. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

SOUZA, C. A. de; Magalhães, G. M. de O.; Souza, P.; Paz, E. S.; Santos, M. R. A. dos. Padrão de crescimento de calos friáveis de folhas, entrenó e nó de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. iberaba Jalapeño. In: **Jornada Científica CEDSA**, 10., 2015, Porto Velho. [Anais...]. Porto Velho: Unir, 2015.

STEIN, V. C.; Bobrowski, V. L.; Vargas, D. P.; Heiden, G.; Iganci, J. R. V. Effect of the Genotype in the Propagation in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 68 - 75, 15 Apr. 2009.

STEVENSON, Philip C Stevenson, P. C., Kite, G. C., Lewis, G. P., Forest, F., Nyirenda, S. P., Belmain, S. R., ... & Veitc. Distinct chemotypes of *Tephrosia vogelii* and implications for their use in pest control and soil enrichment. **Phytochemistry**, v. 78, p. 135-146, 2012.

TAIZ, L; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed Editora Ltda: Porto Alegre. 5ª Edição, 952p. 2013.

THIRUPATHY, S.; Sisubalan, N.; Ghouse, B. M. Callus induction from a wild medicinal plant *Tephrosia hookeriana* (weight and arm). **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 5, n. 6, p. 1027-1030, 2014.

TORRES, Antonio Carlos; CALDAS, Linda Styer. **Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1ª Edição, 1990.

TOUQUEER, Saad; SAEED, Muhammad Asad; AJAIB, Muhammad. A review on the phytochemistry and pharmacology of genus *Tephrosia*. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 598-637, 2013.

UDDIN, A; Khanna, P. Rotenoides in tissue culture of *Crotalaria burhia*. **Planta medica**, v.2, p.181-183, 1979.

WANG, Jing, Qian, J., Yao, L., & Lu, Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2015.

WENJIE, J., Yuchun, F., Chunji, G., Yunhui, W., & Jie, P. Extraction and purification of deguelin from *Derris trifoliata* Lour root. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, 2(4), 98-103, 2010.

ZAFAR, R.; MUJEEB, M. Rotenoids and rutin in callus cultures of *Tephrosia purpurea* (L) pers. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 64, n. 3, p. 217, 2002.

ZHANG, Peiwen, Deqiang Qin, Jianjun Chen, and Zhixiang. Plants in the genus *Tephrosia*: valuable resources for botanical insecticides. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 721, 2020.

ZUBAIRI, S. I.; Sarmidi, M. R.; Aziz, R. A.; Latip, R.; Said. J. The effect of rotenone crude extract from *Derris elliptica* on the larvicidal activity (mortality) of mosquito. In: **Proceeding of Symposium Biologi Kebangsaan**, Awana Genting Highlands, Pahang, Malaysia. 2004.