



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE JENIPAPEIRO

LARISSA LUZIA PEIXOTO NASCIMENTO

2022



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

LARISSA LUZIA PEIXOTO NASCIMENTO

INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE JENIPEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Ana da Silva Ledo
Co-orientador
Prof^º Dr Paulo Augusto Almeida Santos

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

N244i Nascimento, Larissa Luzia Peixoto.
Indução da embriogênese somática de Jenipapeiro / Larissa
Luzia Peixoto Nascimento, orientadora Ana da Silva Ledo . . – São
Cristóvão, SE, 2022.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ana da Silva Ledo

1. Agrobiodiversidade. 2. Jenipapo. 3. Embriologia. 4.
Crescimento (Plantas). I. Ledo, Ana da Silva, orient, II. Título.

CDU: 582.936.1

LARISSA LUZIA PEIXOTO NASCIMENTO

ESTUDOS DA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE JENIPEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 22 de julho de 2022.

Prof^ª. Dr^ª. Ana Veruska Cruz da Silva
PPGAGRI/UFS/Embrapa

Prof^ª. Dr^ª. Caroline de Araújo Machado
SEDUC-SE

Prof^ª. Dr^ª. Ana da Silva Léo
PPGAGRI/UFS/Embrapa
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A minha mãe e meu pai (in memoriam), aos
meus irmãos e toda minha família*
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer me dando o necessário para essa conquista. Ao Arcanjo Miguel e meu anjo da guarda por toda proteção e sabedoria em mim depositadas.

À Dra. Ana da Silva Léo pela orientação, ensinamentos e dedicação dados durante este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros, por toda força e ajuda que me deram, principalmente a Fernanda por todos os ensinamentos trocados.

À minha mãe Telma Maria Gonzaga Peixoto Nascimento por todo amor, incentivo e preocupação, à senhora dedico essa vitória, te amo!

Ao meu pai Francisco Gonçalves Nascimento (*in memoriam*) que me ensinou todos os seus valores e que agora me guia espiritualmente, estaremos sempre juntos.

Aos meus irmãos e sobrinhas por todo amor depositado em mim, por toda alegria e companheirismo em todos os momentos.

A meu marido, Iweng, por me apoiar, por ser meu ponto de equilíbrio e por confiar em minha capacidade.

À minha avó, Jocelina Gonzaga, pelo amor, carinho e ensinamentos preciosos que me passa.

Às minhas tias, principalmente a Ângela, por me oferecer todo carinho e ajuda para completar a minha jornada.

À Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade.

À Embrapa por toda a estrutura e condições para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LARISSA LUZIA PEIXOTO NASCIMENTO, filha de Francisco Gonçalves Nascimento e Telma Maria Gonzaga Peixoto Nascimento, nasceu em 13 de dezembro de 1996, na cidade de Aracaju, Sergipe.

Em janeiro de 2020 graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, Sergipe.

Em março de 2020 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Sergipe. Realizou seus estudos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, submetendo-se à defesa da dissertação em 22 de julho de 2022.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. ASPECTOS GERAIS: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, CLASSIFICAÇÃO ECOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PROPAGAÇÃO.....	2
2.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, ECOLÓGICA E USOS DA <i>Genipa americana</i> L.	3
2.3. CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: CONCEITOS, APLICAÇÕES, ETAPAS E ROTAS DE REGENERAÇÃO	4
2.4. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> COM <i>Genipa americana</i> L.....	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
4. ARTIGO 1: INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JENIPEIRO...	17
Resumo.....	17
Abstract.....	17
4.1. Introdução	19
4.2. Material e Métodos	20
4.2.1. Obtenção de plantas assépticas <i>in vitro</i> fonte de explantes	20
4.2.2. Ensaio de indução e multiplicação de calos embriogênicos (Ensaio preliminar)	20
4.2.3. Efeito do ANA e BAP na indução de calos embriogênicos em acessos de jenipapeiro	21
4.2.4. Estabelecimento da curva de crescimento de calos em acessos de jenipapeiro	21
4.2.5. Ensaio da maturação e regeneração de embriões somáticos	22
4.2.6. Análises histológicas e citoquímicas	22
4.2.7. Análises estatísticas	23
4.3. Resultados e Discussões.....	23
4.3.1. Ensaio de indução e multiplicação de calos embriogênicos no acesso UMB ...	24
4.3.2. Efeito do ANA e BAP na indução de calos embriogênicos em acessos de jenipapeiro	30
4.3.3. Curva de crescimento de calos	34
4.3.4. Análises citoquímicas e histológicas.....	36
4.3.5. Maturação de embriões somáticos	38
4.5. Conclusões	40
4.6. Referências Bibliográficas	40

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura		Página
1	Classificação de calos tipo 1 (A-D) em explantes foliares e calos tipo 2 (E-I) em explantes nodais de <i>Genipa americana</i> L., onde: 0- Ausência de calos; 1- Baixa ou pouca presença de calos; 2- Média presença de calos; 3- Alta presença de calos.....	21
2	Segmento foliar de <i>Genipa americana</i> L. acesso UMB sem (A) e com (B) oxidação.....	25
3	Resposta da indução de calos tipo 1 (%) em explantes nodais e foliares de <i>Genipa americana</i> L. cultivados em meio MS em função: A- concentração de BAP (mg/L); e B- da combinação tipo de explante e concentração de ANA (mg/L).....	26
4	Resposta da indução de calos tipo 2 (%) em explantes foliares e nodais de <i>Genipa americana</i> L. cultivados em meio MS em função da concentração de ANA (mg/L).	27
5	Resposta da indução de calos embriogênicos (%) em explantes de <i>Genipa americana</i> L. cultivados em meio MS em função da concentração de BAP (mg/L) aos 50 dias de cultivo <i>in vitro</i>	28
6	Calos embriogênicos de <i>Genipa americana</i> L. A- Calo embriogênico com meio ½ MS dos sais suplementado de 6 mg/L de BAP com 4 mg/L de ANA. B- Embrião em formato globular (G) e formato coração (C) em meio ½ MS suplementado com 6 mg/L de BAP e 4 mg/L de ANA. C- Embrião Somático em formato cotiledonar (C) em meio MS ½ MS suplementado com 8 mg/L de BAP.....	29
7	Calos foliares de diferentes acessos de <i>Genipa americana</i> L. cultivados com meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP.....	31
8	Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos foliares dos acessos UMB, SC, CER, JSA e SAL inoculados em meio MS suplementados com diferentes combinações de ANA e BAP.....	33
9	Análise com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos a partir de explantes foliares de cinco acessos de <i>Genipa americana</i> L. (UMB, JSA, CER, SAL e SC) cultivados em MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP	35
10	Calos foliares de <i>Genipa americana</i> L. do acesso SAL cultivados em meio MS suplementado com 4,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP	36
11	Estruturas observadas em calos do acesso UMB de <i>Genipa americana</i> L. cultivados em meio MS com diferentes concentrações de ANA (0, 0,5 1,5 e 2,0 mg/L) sem putrescina.....	37
12	Calos de <i>Genipa americana</i> L. expostos a meio MS com diferentes concentrações de ANA (0, 0,5, 1,5 e 2,0 mg/L) e BAP (6 e 8 mg/L)	38
13	Calos embriogênicos, pró-embriões e embriões somáticos iniciando a maturação de <i>Genipa americana</i> L.....	39

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela	Página
1	Indução de calos (notas) em explantes foliares e nodais de <i>Genipa americana</i> L. acesso UMB em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP aos 40 dias de cultura <i>in vitro</i> 23
2	Indução de calos (notas) em <i>Genipa americana</i> L. acesso UMB em meio de cultura MS com diferentes combinações de reguladores de crescimento ANA e BAP aos 40 dias de cultura <i>in vitro</i> 24
3	Resposta da indução de calos tipo 2 (%) em explantes de <i>Genipa americana</i> L. cultivados em meio MS com diferentes combinações de ANA e BAP aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> 27
4	Presença de calos embriogênicos nos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de <i>Genipa americana</i> L. em meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP aos 120 dias de cultura <i>in vitro</i> 30
5	Massa fresca de calos (g) dos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de <i>Genipa americana</i> L. inoculados em meio MS suplementados com diferentes combinações de ANA e BAP aos 30 e 60 dias de cultura <i>in vitro</i> 31
6	Incremento da massa fresca de calos (%) dos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de <i>Genipa americana</i> L. no intervalo de tempo dos 30 dias aos 60 dias de cultura em meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP 32
7	Massa (g), presença de pró-embrião (%) e de embriões em pré-maturação (%) de calos embriogênicos de <i>Genipa americana</i> L. na presença de diferentes concentrações de Phytigel® 38

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BAG	Banco Ativo de Germoplasma
MS	Meio básico de Murashige e Skoog (1962)
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenoacético
BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	2,4-D Isopenteniladenina
UMB	Acesso de Umbaúba-SE
JSA	Acesso de Coronel João Sá-BA
SC	Acesso de São Félix-BA
CER	Acesso do Núcleo Bandeirante-DF
SAL	Acesso de Salvaterra-PA

RESUMO

NASCIMENTO, Larissa Luzia Peixoto. **Indução da embriogênese somática de jenipapeiro.** São Cristóvão: UFS, 2022. 57p. (Dissertação – Mestrado/em Agricultura e Biodiversidade).*

A embriogênese somática é uma técnica na cultura de tecidos que possibilita a aplicação de metodologias para conservação dos recursos genéticos e a propagação de espécies vegetais em larga escala. Em *Genipa americana* L., esta técnica pode viabilizar sua propagação e produção comercial, minimizando as perdas genéticas com o extrativismo, seu único modo de exploração atualmente, além de potencializar seus usos em grandes setores industriais. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo da embriogênese somática no jenipapeiro. O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira com explantes foliares e nodais do acesso UMB, cultivados em meio primário, composto por ½ MS dos sais, 30 g/L de sacarose, 400 mg/L de extrato de malte, 3 g/L de phytigel® e 4 combinações dos reguladores ANA e BAP com as concentrações: 0,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L. Após 40 dias foram avaliados o percentual de cobertura de calos (0 a 3) e os tipos de calos. Aos 90 dias de cultura no escuro, as culturas foram transferidas para o meio secundário (meio primário + 10 µM de 2,4-D) com um fotoperíodo de 12 h. Aos 50 dias no meio secundário foi avaliada a presença de calos embriogênicos e foi feita a indução da maturação por estresse osmótico em meio com diferentes concentrações de Phytigel® (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 g/L). A segunda etapa foi conduzida com explantes foliares de cinco populações de jenipapeiro (UMB, JSA, SC, CER e SAL) em meio primário e 3 combinações dos reguladores ANA e BAP com as concentrações 4,0 e 6,0 mg/L. Em intervalos de 10 dias durante 60 dias foram avaliados o incremento de massa fresca dos calos para a determinação da sua curva de crescimento e a avaliação da indução de calos embriogênicos. A indução de calos foi considerada promissora com notas acima de 2,5, foram observadas características de calos tipo 1, com potencial de gerar calos embriogênicos e calos tipo 2. O desenvolvimento dos calos tipo 1 foi superior na presença dos reguladores de crescimento, as concentrações de 8,0 mg/L de BAP e 6,0 mg/L de ANA para segmento nodal e 8,0 mg/L para explantes foliares. Os calos tipo 2 foram induzidos em maior quantidade em segmentos nodais (100%) na ausência de ANA e de BAP e na presença de 4,0 e 6,0 mg/L de ANA (100%). A concentração de 6,0 mg/L de BAP foi propícia para a indução de calos embriogênicos no ensaio preliminar com o acesso UMB. O acesso SAL foi superior aos demais nas 3 combinações de reguladores testadas com 100% de calos embriogênicos, confirmados a partir de análises citoquímicas com carmin acético e azul de Evans. A curva de crescimento atingiu as fases lag, exponencial e estacionária aos 60 dias de cultura *in vitro*. As concentrações de Phytigel® testadas não apresentaram efeitos significativos na maturação dos embriões.

Palavras-chave: Reguladores de crescimento, curva de crescimento, maturação de embriões.

* Comitê Orientador: Profª Drª Ana da Silva Lédo – UFS/Embrapa (Orientadora). Profº Dr Paulo Augusto Almeida Santos – UFS (Co-orientador).

ABSTRACT

NASCIMENTO, Larissa Luzia Peixoto. **Induction of somatic embryogenesis in genipap.** São Cristóvão: UFS, 2022. 57p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).

*

Somatic embryogenesis is a tissue culture technique that makes genetic resources conservation and the propagation of plant species on a large scale possible. For *Genipa americana* L., this technique can make commercial propagation and production feasible, minimize the genetic drift caused by extractivism, currently the only form of exploitation, and promote the use of this crop in large industrial sectors. Given the above, this study tested somatic embryogenesis in genipap. The experiment was divided into two stages: the first analyzed leaf and nodal explants of the accession UMB, cultivated in a primary medium of half strength Murashige and Skoog salts ($\frac{1}{2}$ MS) with 30 g/L sucrose, 400 mg/L malt extract and 3 g/L gelling agent Phytigel®, plus all 16 possible combinations between the growth regulators naphthaleneacetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) and concentrations of 0.0; 4.0; 6.0 and 8.0 mg/L. After 40 days, the percentage of callus coverage and callus types were evaluated on a 0 - 3 score scale. After 90 days in the dark, the culture was transferred to the secondary medium (primary medium + 10 μ M 2,4-D) with a 12-h photoperiod. After 50 days in the secondary medium, the presence of embryogenic calli was evaluated and osmotic stress maturation induced with different Phytigel® concentrations (3, 5, 7 and 9%). The second step consisted of the cultivation of leaf explants from five genipap populations (UMB, JSA, SC, CER and SAL) in primary medium plus three combinations of NNA and BAP regulators (4.0/4.0; 4.0/6.0 and 6.0/4.0 mg/L NNA and BAP, respectively). For 60 days, every 10 days, the fresh weight increase of the calli was evaluated to establish the growth curve and assess embryogenic callus development. Callus induction at scores above 2.5 was considered promising. Characteristics of type 1 calli were observed, which could possibly generate embryogenic and type 2 calli. Type 1 calli developed better in the presence of growth regulators, i.e., from the nodal segments, at concentrations of 8.0 mg/L BAP and 6.0 mg/L NNA, and from the leaf explants at 8.0 mg/L NNA. Induction of type 2 calli at 100% occurred only in nodal segments in the absence of NNA and BAP and in the presence of 4.0 and 6.0 mg/L NNA. The concentration of 6.0 mg/L BAP promoted induction of embryogenic calli in the preliminary assay with accession UMB. Accession SAL developed more (100%) embryogenic calli than the others in response to the three above regulator combinations, confirmed by cytochemical analyses with acetic carmine and Evans blue. The growth curve reached the lag, exponential and stationary phases after 60 days of in vitro culture. No significant effects of the tested Phytigel® concentrations on embryo maturation were observed.

Keywords: Growth regulators, growth curve, embryo maturation.

* Supervising Committee: D.Sc. Ana da Silva Lédo – UFS/Embrapa (supervising). D.Sc. Paulo Augusto Almeida Santos – UFS (Co-supervising).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Distribuída amplamente pelo continente americano, a *Genipa americana* L., conhecida como jenipapeiro, pertence à família Rubiaceae e possui um alto potencial de uso. Grandes setores industriais como farmacêuticos, têxteis e alimentícios já se beneficiam das propriedades desta espécie (MOURA, 2014). Além disso, é considerada uma das principais espécies utilizadas para a recuperação de áreas degradadas e arborização urbana, por conta de sua boa adaptabilidade às condições de desenvolvimento (NEVES *et al.*, 2017).

Em contrapartida, a sua exploração extrativista indiscriminada coloca em risco sua diversidade genética, comprometendo a regeneração natural e impossibilitando a expansão e aprimoramento de seus usos. Por isso, metodologias tanto de conservação quanto de melhoramento para espécies florestais nativas são essenciais para o desenvolvimento socioeconômico ambiental, uma vez que a conservação dos recursos genéticos garante a perpetuação das espécies e o melhoramento possibilita a produção de plantas em larga escala, atendendo às necessidades do mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Como a germinação do jenipapeiro é lenta e desuniforme, com rápida perda de viabilidade, protocolos para propagação por sementes são desfavoráveis para a espécie. Dessa forma, técnicas da cultura de tecidos se tornam uma alternativa viável, já que são amplamente utilizadas para a conservação e propagação de outras espécies com o mesmo tipo de problema (DIAS *et al.*, 2012).

Dentre as vias de propagação *in vitro*, a embriogênese somática é considerada a melhor opção para as espécies frutíferas, pois permite uma taxa de multiplicação superior a qualquer outra técnica, além de não depender de períodos específicos para obtenção de material vegetativo e ter o controle do tempo de produção, contribuindo para a redução de seus custos (MOURA, 2016).

O processo da embriogênese somática consiste na utilização de células isoladas ou grupo de células somáticas para gerar embriões somáticos, possibilitando a regeneração de uma planta completa, sem a fusão de gametas. Por meio de estímulos exógenos, é possível seguir por duas vias: a direta, quando os embriões se formam diretamente do explante, e a indireta, passando pela etapa de calogênese antes da indução de embriões somáticos, sendo esta última, a mais promissora em espécies da mesma família, como café (BARTOS, 2012).

Entretanto, resultados da embriogênese somática no jenipapeiro são inexistentes, sendo necessário o desenvolvimento de um protocolo básico para servir como banco de dados com indicação do melhor tipo de explante, reguladores de crescimento e comportamento de acessos para indução embriogênica, além de análises histológicas e citoquímicas para a caracterização deste processo em todas as suas etapas.

Deste modo, o objetivo geral deste trabalho foi o estudo da indução da embriogênese somática no jenipapeiro testando diferentes tipos de explante, acessos e concentrações de reguladores de crescimento visando à regeneração de plantas em larga escala.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais: distribuição geográfica, classificação ecológica, caracterização morfológica e propagação

A *Genipa americana* L. é uma espécie dicotiledônea pertencente à família Rubiaceae, classificada como a quarta maior família da classe das angiospermas (RUZZA *et al.*, 2020). O gênero *Genipa* é constituído por apenas duas espécies, a *Genipa americana* e a *Genipa infundibuliformis* Zappi & Semir, sendo a primeira distribuída em grandes centros de diversidade desde o México até a Argentina e ainda presente em países da Ásia e África, e a segunda é encontrada somente no centro-sul do Brasil (SILVA *et al.*, 2015; SOUZA, 2016).

Bastante abundante no país, está presente em quase todo seu território, sendo distribuída em todas as regiões brasileiras e em todos os biomas, exceto no pampa (RS), que corresponde apenas a 2,07% do território brasileiro (MMA, 2020).

Em função da sua ampla distribuição, esta espécie possui vários nomes vulgares pelo Brasil: cabaçu, janapabeiro, janipapeiro, jenipá, jenipapo manso, jenipapo branco, jenipaca, sendo jenipapo o nome mais conhecido (RAMALHO, 2003).

O jenipapeiro é flexível quanto às características para o seu desenvolvimento, se comportando bem em climas tropicais, se adaptando a diversos tipos de solos e até aqueles que são periodicamente inundados e pobres em nutrientes (ALMEIDA *et al.*, 2013). A faixa de temperatura para o plantio é de 18 °C a 28 °C, porém esta espécie não apresenta restrições a altas temperaturas e aceita um intervalo significativo de pluviosidade, entre 800 e 4000 mm (LORENZI, 1992; ZAPPI *et al.*, 2015).

Quanto ao grupo sucessional ao qual está inserido, existem estudos que apontam o jenipapeiro como uma espécie pioneira (SALOMÃO *et al.*, 2003), secundária inicial (ANDRADE *et al.*, 2000) e como secundária tardia, sendo este último o grupo mais comumente citado (NOGUEIRA, 2015).

Como características botânicas, é considerada uma espécie arbórea semidecídua de tronco reto e cilíndrico, resistente, de copa frondosa podendo chegar até 25 m de altura (ERBANO *et al.*, 2010), casca pouco espessa, possui folhas simples, opostas, oblongo-ovadas e coriáceas, com um pecíolo curto e duas estípulas (GOMES, 2020). As flores são hermafroditas brancas, mudando de coloração à medida que vão envelhecendo e ficando amarelas e o fruto é do tipo baga globosa, com inúmeras sementes que podem ser compridas, trígonas ou até arredondas (MAGISTRALI *et al.*, 2013).

A sua propagação pode ser sexuada e assexuada, sendo a primeira mais utilizada (DANTAS *et al.*, 2009). A propagação por sementes do jenipapeiro é marcada por uma germinação lenta, assíncrona, de baixa uniformidade e sensível a fatores de estresses abióticos como a salinidade, sodicidade e restrição hídrica, gerando dificuldades no desenvolvimento das plantas em viveiros de produção de mudas (SILVA *et al.*, 2020). Além disso, é considerada como intermediária, ou seja, as suas sementes têm a viabilidade afetada quando seu teor de umidade está abaixo de 10%, não são tolerantes a frio e perdem sua viabilidade por completo em até 60 dias de armazenamento (MAGISTRALI *et al.*, 2013).

Apesar dos estudos sobre a sua germinação desde a década de 90 e considerando os tipos de armazenamento x viabilidade (CRUZ *et al.*, 1998), temperatura, substrato e concentrações de reguladores de crescimento (COSTA *et al.*, 2005), a espécie não possui um método de propagação ideal para o seu desenvolvimento inicial (MOURA, 2014).

Para a propagação assexuada tem-se relatos por alporquia (CARVALHO, 2003), que consiste em utilizar um ramo não podado, que é estimulado para o desenvolvimento de raízes, através do anelamento e do envolvimento do substrato umedecido. Pós a formação das raízes, este ramo é individualizado, e assim formando uma nova planta e por enxertia (PRADO NETO *et al.*, 2007), união de um ramo em outra planta formando um único indivíduo. Além desses métodos tradicionais, a propagação sexuada e assexuada por cultura de tecidos de plantas tem sido amplamente estudada com o estabelecimento de protocolos de conservação,

por crescimento lento e criopreservação e propagação por organogênese já foram estabelecidos (SILVA *et al.*, 2020). Considerando que espécies florestais nativas, assim como jenipapo, são vulneráveis por conta da fragmentação de seus biomas e da substituição de seu habitat natural por produção de animais e monocultivos, a cultura de tecidos se apresenta como uma ferramenta para a consolidação de gerações futuras (SILVA *et al.*, 2022).

2.2 Importância econômica, ecológica e usos da *Genipa americana* L.

A *Genipa americana* L. é uma espécie utilizada para diversos fins, seja *in natura* ou como matéria-prima para outros produtos, movimentando o comércio de pequenos produtores garantindo renda e gerando empregos no mercado informal (RABBANI *et al.*, 2012).

Cultivado em pequena escala em pomares e roças indígenas, o jenipapeiro ainda possui a exploração extrativista com principal forma de garantir recursos para atender a demanda do mercado (SILVA *et al.*, 2021). É notório o crescimento do consumo da fruta, com base em dados da Central Estadual de Abastecimento do Espírito Santo-CEASA-ES, entre 2002 e 2012, foram comercializadas cerca de 39,2 toneladas de frutos, sendo que o ano de 2012 foi responsável por 11 toneladas do total de vendas (CAMPO VIVO, 2012). Em 2017, aproximadamente 16 toneladas do jenipapo foram comercializadas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo-CEAGESP, compondo o 254º lugar no ranking de frutos mais comercializados (CEAGESP, 2017).

É uma espécie considerada prioridade pelo programa Plantas para o Futuro para cultivo e exploração na região Nordeste (CORADIN *et al.*, 2018) e no Centro-Oeste (MMA, 2016), com grande potencial de uso imediato entre as frutíferas nativas (SAMPALIO *et al.*, 2005). Com seu destaque sendo evidenciado, estratégias de conservação para seus recursos genéticos foram estabelecidas e, em 2009, um Banco Ativo de Germoplasma-BAG foi implantado pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo experimental Jorge do Prado Sobral, Nossa Senhora das Dores, SE. O BAG Jenipapo atualmente possui cerca de 210 acessos coletados nos estados de Sergipe, Bahia, Ceará, Minas Gerais e Distrito Federal (SILVA *et al.*, 2021).

Praticamente todas as partes da árvore são aproveitadas. Os frutos ricos em proteína, ferro, fósforo, cálcio e vitaminas são utilizados *in natura* na alimentação humana, na fabricação de doces, compota, suco, refresco, vinho e aguardente (HAMACEK *et al.*, 2013). O licor é uma importante bebida das festas juninas no Nordeste, sobretudo na Bahia e em Sergipe. Seu fruto *in natura* é apreciado por muitos por conta de seu sabor marcante, já seu suco, quando fermentando, é utilizado para preparações como compotas, doces e sorvetes, e em bebidas como licores, vinhos e aguardentes (PACHECO *et al.*, 2014). Sua madeira possui características ideais para movelaria, com uma boa trabalhabilidade e flexibilidade, sendo usada em construções navais e civis, móveis de valor agregado, cabos de ferramentas e para carpintaria em geral (CAMPELO, 2015).

Sua casca e frutos imaturos possuem uma substância iridoide, a genipina, que em contato com o ar ou com proteínas se torna um corante azul escuro e preto, poderoso para a indústria têxtil, farmacêutica, cosmética, entre outras (ERBANO *et al.*, 2010). A genipina é usada historicamente pelos índios para tingir tecidos, pintar os corpos em cerimônias religiosas e enfeites (BELLÉ, 2017).

Alguns estudos revelaram o potencial medicinal da goma extraída do tronco das árvores de jenipapeiro e do chá de suas raízes (RENHE *et al.*, 2009). O extrato das folhas é rico em polissacarídeos, sendo caracterizado como farmacologicamente promissor (NONATO *et al.*, 2018), conferindo à espécie o uso na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica (NERI-NUMA, 2018), além da indústria de cosméticos. São descritas diversas propriedades medicinais como agente antiasmático, antianêmico, diurético, afrodisíaco, antisifilítica, tônico, antioxidante, anti-inflamatório e antiangiogênica (SILVA *et al.*, 2015). O extrato do fruto aquoso tem o poder repelente e antialimentares em flebotomíneos do gênero *Lutzomya*,

que são principais vetores de transmissão de doenças como leishmaniose, bartonelose e febre por flebótomos (PÉREZ *et al.*, 2006).

No uso popular é relatado o poder purgativo e antigonorreico do chá das suas raízes, a casca do tronco é usada como antidiarreico, emplasto para úlceras, dores, luxação, hematomas e faringite (CORDEIRO *et al.*, 2014). Suas folhas são utilizadas para doenças do fígado e febrífugo (ERBANO *et al.*, 2010).

Por conta da boa adaptabilidade ecológica no seu desenvolvimento e seu efeito biorremediador, a *G. americana* L. também é utilizada para projetos de recuperação de áreas degradadas desde o menor grau causados por desmatamento, agricultura e pecuária, até o mais alto nível, causado por atividades de mineração (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

2.3. Cultura de tecidos de plantas: conceitos, aplicações, etapas e rotas de regeneração

A cultura de tecidos de plantas tem se mostrado bastante eficiente na seleção, aumento da produtividade e melhoramento genético de plantas. Iniciada nos primórdios do século XX, ela abrange diversas subáreas como a fitopatologia, engenharia genética, química, fisiologia, citogenética, bioquímica, biologia molecular, entre outras (ITHAPE *et al.*, 2017).

É definida como uma técnica de multiplicação ou clonagem de um material genético por meio do isolamento de pequenos fragmentos de tecido vivo, definido como explante, de um organismo vegetal. Estes explantes são desinfestados e inoculados em meio de cultura, em condições de temperatura e luminosidade específica até a geração de uma nova planta com a mesma carga genética (MORAIS *et al.*, 2012).

Além da produção de clones, a técnica da cultura de tecidos de plantas permite a produção de mudas em grande escala, pois possibilita a manutenção de maior quantidade de propágulos em espaços pequenos. Essa manutenção mais facilitada é importante também para a conservação de germoplasma *in vitro*, uma vez que o material genético estará seguro, sem pragas, e a depender da metodologia aplicada, como a criopreservação, o envelhecimento dos explantes será inibido (CANÇADO *et al.*, 2009; ISAH, 2016).

Na cultura de tecidos de plantas, a maioria das células pode ser considerada como um explante, seja fragmentos de raiz, folhas, caules e tantos outros, desde que possam ser estimulados nas condições de indução do meio de cultura, para a sua regeneração. A responsável por esse estímulo é a totipotência vegetal, primeiro princípio da cultura de tecidos que se define como a capacidade da célula vegetal se diferenciar e formar um novo indivíduo (MANTELL *et al.*, 1994).

A regeneração e a multiplicação acontecem por duas vias: organogênese e embriogênese somática, sendo que as duas podem ocorrer de forma direta e/ou indireta (MANTELL *et al.*, 1994). Na via direta a regeneração ocorre a partir de tecidos dos explantes, e a indireta, quando a regeneração apresenta uma etapa anterior à regeneração denominada de calogênese. O calo é um grupo de massas celulares pouco diferenciadas que são formadas antes da regeneração do indivíduo (TORRES *et al.*, 2000).

O processo da organogênese é definido como a formação de órgãos vegetais, brotos ou raízes, a partir de uma ou mais células, é monopolar, ou seja, ocorre o desenvolvimento de uma parte por vez e possui uma conexão vascular com o explante (KERBAUY, 1997). A organogênese é regida por um balanço hormonal entre as classes das citocininas, regulador de crescimento que induz o crescimento de brotos e das auxinas, que promovem o crescimento da parte radicular (ANDRADE *et al.*, 2000).

Este balanço é apresentado por Skoog e Miller (1957), que em estudos com células de tabaco observaram que na presença de maior quantidade de citocininas em relação às auxinas, ocorre primeiro o crescimento da parte aérea, as brotações e, em condição inversa, o desenvolvimento das raízes. Quando a relação entre as duas classes de reguladores de crescimento é equimolar ocorre o desenvolvimento dos calos, ou seja, a organogênese indireta (MARTINS *et al.*, 2012).

Tendo como princípio a totipotência celular, o processo de embriogênese somática inicia-se com a etapa da indução embriogênica de uma única ou grupo de células somáticas, resultando em uma estrutura bipolar, contendo meristemas apicais aéreos e radiculares, diferenciados em polos opostos (radicular e parte aérea) simultaneamente (WILLIAMS *et al.*, 1986). Essas células passam por estágios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como uma estrutura sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (explante) (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

A embriogênese somática permite a produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente o custo por unidade de muda produzida (GUAN *et al.*, 2016), além de ser a única técnica de propagação vegetativa que produz mudas clonais com raízes pivotantes. Em condições apropriadas, os embriões somáticos podem ser obtidos de forma sincronizada, com elevado grau de uniformização clonal e conformidade genética, o que torna a embriogênese somática uma importante técnica de propagação de plantas (MOURA, 2016).

A técnica da embriogênese somática possui outras aplicações, como: produção de sementes sintéticas, conservação de germoplasma, proporcionando flexibilidade ao programa de melhoramento, manipulação genética, pelo desenvolvimento de plantas transgênicas (ANDRADE, 2002), rejuvenescimento de clones com características de interesse, mas que possuem desvantagens como baixa porcentagem de enraizamento ou crescimento plagiotrópico das mudas (sem ramificação) (PAIS, 2019).

O processo de embriogênese somática passa por etapas de indução, multiplicação, maturação e germinação. Para a indução das massas pró-embriogênicas ocorrer, é necessário que o explante seja estimulado físico, químico ou fisiológico, sendo normalmente aplicadas combinações de reguladores de crescimento das classes auxinas e citocininas, que controlam a proliferação celular (PINHAL *et al.*, 2011). Além disso, nas plantas, as citocininas também são necessárias para o estabelecimento da estrutura bipolar em embriões, além de melhorar o desenvolvimento embrionário após a indução do embrião somático (REE; GUERRA, 2015).

O equilíbrio hormonal entre os reguladores de crescimento determina se a diferenciação celular ocorrerá e qual rota regenerativa ele seguirá. Portanto, o efeito fisiológico sobre o explante depende principalmente de sua concentração no meio de cultura (TERMIGNONI, 2005).

Na multiplicação, as auxinas precisam estar em baixas concentrações ou até mesmo ausentes no meio de cultura devido à hipometilação do ácido desoxirribonucleico-DNA. Este evento epigenético desencadeia uma elevação na expressão gênica, iniciando uma série de ciclos repetitivos de divisão celular (LIDDLE *et al.*, 2006; citados por COSTA *et al.*, 2013). O grupo das poliaminas têm funções de regulação de processos fisiológicos durante a divisão celular e, dentro deste grupo, a putrescina tem sido alvo de estudos em vários trabalhos, evidenciando a sua importância no estabelecimento da embriogênese somática (MOURA, 2016). O seu balanço com outros reguladores como o ácido abscísico favorece altas taxas de conversões de embriões somáticos em algumas espécies (CVIKROVÁ *et al.*, 1998).

A maturação ou regeneração dos embriões é realizada por influência de agentes osmóticos e reguladores de crescimento que estão presentes no meio de cultura, eles fornecem estímulos necessários que cessam as divisões celulares da fase anterior, levando os embriões a um estágio maduro (FURTADO, 2009). A última fase, a germinação, é a formação de plântulas por meio de embriões somáticos maduros, reguladores de crescimento também podem auxiliar um melhor desempenho nesta etapa (OLIVEIRA, 2018).

A embriogênese somática indireta, com a calogênese, é uma rota promissora e tem sido utilizada na maioria das espécies vegetais com protocolos específicos e otimizados para cada genótipo (BARTOS, 2012). Mesmo que a indução de calos seja sob condições controladas, o resultado do processo está ligado a fatores como idade e tipo de explante. Estudos mostram que apesar de explantes de diferentes idades serem capazes de gerar calos, tecidos mais jovens têm uma maior capacidade de expressar totipotência, considerando sua

plasticidade morfogênica (HARTMANN *et al.*, 2018). Adicionalmente, segmentos nodais e foliares possuem grande potencial de formarem calos (REBOUÇAS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Bartos (2012) classificou os diferentes tipos de formação de calos em café: os calos primários com crescimento não persistente (Tipo 1), calos primários com crescimento persistente (Tipo 2) e os calos embriogênicos. Estes calos possuem características fenotípicas diferentes, sendo que o primário tipo 1 tem sua formação em grânulos iniciada nas bordas das folhas, com estrutura compacta de coloração levemente amarelada e crescimento regular, podendo ou não dar origem a calos embriogênicos. Já o calo tipo 2, não embriogênico, é caracterizado como compacto, aquoso, esbranquiçado, com crescimento desordenado e intenso, competindo espaço com os calos embriogênicos. Anatomicamente esse tipo de calo possui células parenquimáticas alongadas, com amplos espaços intercelulares, núcleos poucos evidentes e vacúolos bem desenvolvidos.

Os calos embriogênicos são os calos friáveis, eles possuem uma coloração amarelo intenso, com crescimento reduzido, suas formas anatômicas são caracterizadas por serem semelhantes às células meristemáticas, de tamanho pequeno, com citoplasma denso, paredes mais estreitas, núcleo grande central e nucléolos mais evidentes e formato celular isodiamétrico, vacúolos são pequenos e fragmentados, eventualmente há presença de grão de amido localizado próximo ao núcleo (SILVA *et al.*, 2020).

Para a visualização dos tipos de calos, em suas estruturas e origens são realizadas análises histológicas que permitem através de cortes anatômicos diferenciar as células embriogênicas e não embriogênicas, de acordo com as características anatômicas de cada uma (RABELO, 2019). Além das análises histológicas, os calos podem ser expostos a testes com corantes que identificam seus componentes, como o corante Lugol que visualiza o amido das células embrionárias, Sudan III para lipídios de células embrionárias e o azul de Evans e carmim acético para a visualização de pró-embrião somático (GUERRA *et al.*, 1999).

Ao longo do tempo, estudos complementares foram realizados sobre composição do meio, condições físicas da cultura, tipo de indução de estresse e tipo de auxina, mas alterando o genótipo, muitas vezes os resultados esperados não foram alcançados. Também o tipo de explante doador diverge entre as espécies em estudo (PAIS, 2019).

2.4 Estudos *in vitro* com *Genipa americana* L.

Poucos protocolos foram estabelecidos para a cultura *in vitro* de *Genipa americana* L., mesmo que seja considerada uma boa estratégia para a propagação e a conservação da espécie, já que é uma possibilidade para uma produção comercial em larga escala e conservação da variabilidade genética (PINHAL *et al.*, 2011).

Conforme apresentado na Tabela 1, a maioria dos protocolos de regeneração *in vitro* foi estabelecida via organogênese, constatando-se que esta espécie possui um bom potencial organogênico (YEE *et al.*, 2010). Entretanto, observa-se a ausência de protocolos de embriogênese somática.

Dentre os aspectos observados nos trabalhos desenvolvidos sobre a cultura de tecidos do jenipapeiro, observa-se um padrão na escolha do meio de cultura, onde comumente é utilizado o meio MS, estabelecido por Murashige e Skoog (1962), sendo diferenciado pelas porcentagens de sais usadas. A adição de reguladores de crescimento é recorrente, principalmente das classes das auxinas, como ácido indolbutírico-(AIB), ácido nafetalenoacético-(ANA) e 2,4-Diclorofenoxiacético-(2,4-D), este último, utilizado para a regeneração indireta, na indução de calos (SERRANO *et al.*, 1996). A possibilidade de formação de calos permite a abrangência de estudos relacionados à embriogênese somática e produção de metabólitos secundários (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Ao ampliar a visão para outras espécies que estão inseridas na família Rubiaceae, a *Coffea arabica* L. pode ser considerada uma espécie modelo, pois possui diversos protocolos já definidos de embriogênese somática para diferentes tipos de explantes: folhas (ALMEIDA

et al., 2008), raiz (ALVES *et al.*, 2020), segmentos nodais (RIBEIRO *et al.*, 2002), fragmentos de entrenós (DUBLIN, 1980), protoplastos (SCHOPKE *et al.*, 1987) e suspensões celulares (RODRIGUEZ *et al.*, 2000), sendo o primeiro o mais utilizado (TEXEIRA *et al.*, 2004).

Este sucesso embriogênico com o café pode ser a base para formulação de metodologias para outras espécies, como a *Genipa americana* L. Aspectos como tipos e composição de meio, explantes e condições de cultivos são levados em conta e adaptados no desenvolvimento de novos protocolos.

Tabela 1. Resultados alcançados com a aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas na propagação *Genipa americana* L.2007-2019.

Referências	Explante	Meio de cultura	Método	Condições de cultivo	Resultados
Rebouças <i>et al.</i> , 2007	Segmentos caulinares	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 8 g/L de ágar	3,0 mg/L de AIB	Escuro (120 dias)	85% de explantes responsivos e maior n° de embriões
Rebouças <i>et al.</i> , 2007	Segmentos de epicótilo	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 8 g/L de ágar	3,0 mg/L de 2,4-D 1,5 mg/L de 2,4-D	Escuro (120 dias)	3,0 mg/L de 2,4 D favoreceu maior n° de calos friáveis 1,5 mg/L de 2,4 D favoreceu maior n° de explantes com embriões
Moreira <i>et al.</i> , 2007	Segmentos do hipocótilo	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose e 4 mg/L de BAP	Posição vertical invertida (VI) Posição vertical normal (VN)	fotoperíodo de 16 h a 27 °C±1 °C (60 dias)	Posição VI proporciona mais eficiência organogênica Posição VN proporciona maior n° de brotação e folhas expandidas
Rocha <i>et al.</i> , 2008	Segmentos do hipocótilo	Meio MS básico +30 g/L de sacarose +2,0 g/L de Phytigel® +2,2 g/L de BAP	2,0 mg/L de AIB	Fotoperíodo de 16 h a 25 °C±2 °C (60 dias)	Maior índice de rizogênese
Almeida <i>et al.</i> , 2013	Sementes	Meio ½ MS + 30 g/L de sacarose	-	Fotoperíodo de 12 h a 25 °C±2°C (120 dias)	Formação de 78% de plântulas normais
Almeida <i>et al.</i> , 2015	Segmento nodal	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 4,5 g/L de Phytigel®	8,0 mg/L de 2,4-D + 0,77 mg/L de BAP	Escuro (90 dias) a 25 °C±2°C + fotoperíodo de 12 h a 25 °C±2 °C (30 dias)	Acima de 90% de respostas morfogênicas
Oliveira <i>et al.</i> , 2017	Embriões zigóticos	Meio MS básico +30 g/L de sacarose + 4 g/L de Phytigel® + 4,44 µM de BAP	0,6 mg/L de ANA	Fotoperíodo de 16 h a 25°C ± 2°C (45 dias)	Regeneração de 70% dos embriões zigóticos
Oliveira <i>et al.</i> , 2017	Segmento foliar	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 1,77 mg/L de BAP	6,0 mg/L de 2,4-D	Escuro a 25 °C ± 2 °C (60 dias)	Maior incremento de massa fresca de calo (142,05 mg)
Oliveira <i>et al.</i> , 2018	Segmento foliar	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 4 g/L de Phytigel®	2,0 mg/L de 2,4-D	Fotoperíodo de 16 h a 25 °C ± 2 °C (90 dias)	Após 60 dias ocorreu uma maior indução de calos
Souza <i>et al.</i> , 2019	Segmentos de hipocótilo	Meio MS básico + 30 g/L de sacarose + 7 g/L de agar	1,12 mg/L de BAP	Fotoperíodo de 16 h a 25 °C±2 °C (40 dias)	80% de regeneração da parte aérea e alta capacidade de aclimatação com 90% de sobrevivência 30 dias após a exposição.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. S.; LÉDO, A. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F.; SANTOS, J. E.; RIBEIRO, M. M. J.; VILANOVA NETA, J. L. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* do jenipapeiro. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, 2013.

ALMEIDA, C. S.; SILVA, A. V. C.; ARAÚJO, A. G.; LÉDO, A. S. Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n.1, p.58-64, 2015.

ALMEIDA, J. A. S.; SILVAROLLA, L. C. F.; STANCATO, G. C. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v. 3, n. 2, p. 143-151, 2008.

ALVES, I. S.; NEOFITI, W. C. F.; CARMAZINI, V. C. B.; ALMEIDA, J. A. S. Embriogênese somática indireta e direta em explante de raiz de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). **Revista de Biologia Neotropical / Journal of Neotropical**, v. 17, n. 2, p. 157-161, 2020.

ANDRADE, C. S.; SOUZA, A. F.; RAMOS, A. de N. R.; PEREIRA, F. S.; CRUZ, T. P. M. A. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p.609-615, 2000.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. p. 14.

BARTOS, P. M. C. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

BELLÉ, A. S. **Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) para imobilização de enzimas**. 2017. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2017.

CAMPELO, S. R. **Avaliação das propriedades anatômicas, físicas, químicas e de colagem da madeira de *Genipa americana* L.** 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2015.

CAMPO VIVO. **Cresce a comercialização do jenipapo na Ceasa/ES**. Disponível em: <http://campovivo.com.br/sem-categoria/Cresce-a-comercializacao-do-jenipapo-na-Ceasa-ES/>. Acesso em: 07 fev. 2022.

CANÇADO, G. M. A.; RIBEIRO, A. P.; FREITAS, G. F.; SÁ, M. E. L.; SILVA, H. E.; PASQUAL, M.; VAL, A. D. B.; NUNES, C. F. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**. Embrapa Informação Tecnológica, Colombo: PR, Embrapa Florestas, v. 1, p. 1039, 2003.

CEAGESP. **Jenipapo**. Disponível em: <https://ceagesp.gov.br/guia-ceagesp/jenipapo/?hml=true>. Acesso em: 07 fev. 2022.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018 (Série Biodiversidade; 51). Disponível em: https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora/copy_of_LivroNordeste21122018. Acesso em: 07 fev. 2022.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

COSTA, M. C.; FIGUEIREDO, A. E.; ALBRECHT, J. M. F.; COELHO, M. F. B. Substratos para produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2005.

CRUZ, M. I. M.; SANTOS, D. S. B.; FILHO, B. G. S.; CARVALHO, J. E. U.; CARVALHO, C. J.; VIEIRA, I. M. Viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a três condições de armazenamento em diferentes períodos. XLIX CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. **Anais...** Salvador, Bahia: 1998.

CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; EDER, J.; HRUBCOVÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 247-255, 1998.

DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS, R. O. S.; SANTOS, L. S. L. **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 509, 2009.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique: deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. **Café, Cacao, Ihé**, v. 24, n. 2, p. 121-130, 1980.

ERBANO, M.; DUARTE, M. R. Leaf and stem morpho-anatomy of *Genipa americana* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 825-832, 2010.

FURTADO, M. B. **Indução e controle da embriogênese somática em *O. cathariensis* e *O. odorífera* (Lauraceae)**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2009.

GOMES, M. **Genipa in Flora do Brasil 2020 em construção**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB14045>. Acesso em: 5 out. 2020.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- CBAB. v. 2, p. 533-568, 1999.

GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 398, 2016.

HAMACEK, F. R.; MOREIRA, A. V. B.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do Cerrado de Minas Gerais. **Alimentação e Nutrição/ Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 3, 2013.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L.; WILSON, S. B. **Plant propagation: principles and practices**. ed. 9, p. 1024, 2018.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, 2016.

ITHAPE, D. M.; MAHARANA, M.; TRIPATHY, S. K. Scope of genetic transformation in sugarcane: a review. **Genomics and Applied Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2017.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. p.365.

MAGISTRALI, P. R.; JOSÉ, A. C.; FARIA, J. M. R.; GASPARIN, E. Comportamento fisiológico de sementes de *Genipa americana* L. quanto à tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 495–500, 2013.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. (eds) **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 101-181, 1994.

MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas, 3., **Anais...Aracaju: Embrapa:Tabuleiros Costeiros**, 2012.

MMA. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-oeste**, Brasília, 2016.

MMA. **Pampa**. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/pampa.html>. Acesso em: 6 out. 2020.

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 medicinais**, v. 14, n.1, 2012.

MOREIRA, M. J. S.; ROCHA, M. A. C.; BASTOS, L. P.; COSTA, A. P. C. Multiplicação *in vitro* de *Genipa americana* L.: Efeito da orientação do explante no meio de cultura. 3º

Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 3., **Anais...** 2007.

MOURA, L. C. **Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* spp.** 2016. 83f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2016.

MOURA, R. S. de. **Diversidade genética e germinação de jenipapo.** 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NEVES, N. G.; TARONE, A. G.; TOSI, M. M.; MARÓSTICA JÚNIOR, R. M.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 102, p. 1-10, 2017.

NERI-NUMA, I. A. **Avaliação das propriedades funcionais dos iridóides obtidos do jenipapo (*Genipa americana* L.).** 2018. 226f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-SP, 2018.

NOGUEIRA, F. F. **Avaliação do crescimento inicial de espécies nativas para restauração florestal.** Universidade Federal do Espírito Santo. 2015. 32f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso), Jerônimo Monteiro-ES, 2015.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NONATO, D. T. T; VASCONCELOS, S. M. M; MOTA, M. R. L; SILVA, P. G. P.; CUNHA, A. P; RICARDO, N. M. P. S.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S.; CHAVES, E. M. C. The anticonvulsant effect of a polysaccharide-rich extract from *Genipa americana* leaves is mediated by GABA receptor. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 101, p. 181-187, 2018.

OLIVEIRA, A. A. A de; MACHADO, C. de A.; OLIVEIRA, L. A. R de; PADILHA, F. F.; SILVA, A. V. C da; LÉDO, A. da S. Induction and growth curve of calli from leaf and nodal explants of genipap. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 6, p. 161–167, 2018.

OLIVEIRA, A. C. A de; OLIVEIRA, L. A. R. de; NASCIMENTO, C. M do; SANTANA, F. V.; SILVA, A. V. C da; LÉDO, A. da S. Indução de calos em explantes foliares de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). In: Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 3. **Anais...** Aracaju, 2017.

OLIVEIRA, A. C. A. de *et al.* *In vitro* morphogenic response from zygotic embryos of *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, p. 2016–2018, 2017.

OLIVEIRA, F. L. R. **Embriogênese somática em jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.)).** 2018. 77f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2018.

- OLIVEIRA, L. S de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; PASSOS, F. B.; AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, F. F.; SOUSA, S. R. Crescimento de espécies nativas em um plantio de recuperação de Cerrado sentido restrito no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2015.
- PACHECO, P.; DA PAZ, J. G.; SILVA, C. O. da; PASCOAL, G. B. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) in natura. **Demetra: alimentação, nutrição e saúde**, v. 9, n. 4, p. 1041-1054, 2014.
- PAIS, M. S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment. **Frontier Plant Science**, v. 28, 2019.
- PÉREZ, J. E.; MALDONADO, H.; REYES, U.; OGUSUKU, E. BAUER, I. *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a tropical plant with sandfly repelling properties. **Revista Peruana de Entomologia**, v. 45, p. 111-113, 2006.
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J. da; MORAIS, T. P. de ; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- PRADO NETO, M.; DANTAS, A. C. V. L.; VIEIRA, E. L.; ALMEIDA, V. de O. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 693–698, 2007.
- RABBANI, A. R. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Variabilidade genética de *Genipa americana* L. pertencente ao baixo curso do rio São Francisco. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 401-409, 2012.
- RABELO, B. O. **Desenvolvimento de massa calogênica em clones de *Theobroma cacao* L. e citogenética de calos radiculares**. 2019. 44f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista-BA, 2019.
- RAMALHO, P. E. **Jenipapeiro**. Colombo: Embrapa Florestas (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 80). p.14, Colombo, 2003.
- REBOUÇAS, F. S.; CARMO, D. O.; SILVA, R. P.; COSTA, A. P. C.; ALMEIDA, W. A. B. Efeito do ANA e AIB na indução de calos em explantes de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas 3., **Anais...** Cruz das Almas-Bahia, 2007.
- REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 589-602, 2015.
- RENHE, I. R. T.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, F. F.; OLIVEIRA, T. V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 649-652, 2009.

- RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Multiplicação *in vitro* de brotações de várias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 5, p. 949-954, 2002.
- ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LÉDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p.769-774, 2008.
- RODRÍGUEZ, M.; CEVALLOS, A.; MONTES, S. Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *Coffea* spp. **Cultivos Tropicales**, v. 21, n. 2, p. 11-15, 2000.
- RUZZA, D. A. C.; ROSSI, A. A. B.; FERNANDES, J. M.; PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; BISPO, R. B.; MARTINS, K. C. Etnobotânica do jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae) entre agricultores no município de Carlinda, Mato Grosso. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 24, 2020.
- SALOMÃO, A. N.; SOUSA-SILVA, J. C.; DAVIDE, A. C.; GONZÁLES, S.; TORRES, R. A. A.; WETZEL, M. M. V. S.; FIRETTI, F.; CALDAS, L. S. Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do cerrado. **Rede de Sementes do Cerrado**, p. 96, 2003.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUERÔA, J. M de; SANTOS JÚNIOR, A. G. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, p. 331, 2005.
- SCHOPKE, C.; MULLER, L. E.; KOHLENBACH, H. W. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplasts cultures from somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P. ex Fr). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 8, p. 243-248, 1987.
- SERRANO, M. S.; PINOL SERRA, M. T. **Biotecnologia Vegetal**. Ciencias de la vida, p. 285, 1996.
- SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S.; SILVA JUNIOR, J. F. **Descritores para o jenipapeiro**. Brasília, DF: Embrapa; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2020, 57p.
- SILVA, A. V. C. da; LEDO, A da S. Banco genético de jenipapo. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; SOUZA, F. V. D.; PÁDUA, J. G. (Org.). **A arca de Noé das frutas nativas brasileiras**. 1ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 150-154, 2021.
- SILVA, F. S.; SILVA JUNIOR, J. F.; NASCIMENTO, W. F.; SILVA, A. C. B. L. Recursos genéticos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em áreas protegidas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 44, n. 1, p.7, 2022.
- SILVA, L. A.; RESENDE, O.; VIRGOLINO, Z. Z.; BESSA, J. F. V.; MORAIS, W. A.; VIDAL, V. M. Cinética de secagem e difusividade efetiva em folhas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 953-963, 2015.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p.118–131, 1957.

SOUZA, F. P. **Caracterização de Jenipapo (*Genipa americana* L.) e de produtos alimentícios elaborados a partir deste fruto**. 2016. 67f. (Monografia) - Universidade Federal de Campina Grande, 2016.

SOUZA, R. R.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, R. R.; SILVA, D. P. C.; REIS, M. V.; PAIVA, R. Morphogenetic potential of different sources of explants for efficiency *in vitro* regeneration of *Genipa* sp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 153-160, 2019.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. 1 Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

TEXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia., p. 39, 2004. (Documentos, n. 121)

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 128, 2000.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHO, K.; FILANOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.233-249, 2002.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

YEE, T. F.; GOH, C. J.; RAO, A. N. *In vitro* studies on *Genipa americana*. **Jornal of Tropical Medicinal Plants**, v. 11, n. 1, p. 77–88, 2010.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; M.T, B.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113. 2015.

4. ARTIGO 1

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ACESSOS DE JENIPAPEIRO

Periódico submetido (ou a ser submetido): *Ciência Rural*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a indução da embriogênese somática indireta em acessos de jenipapeiro. O ensaio preliminar para a identificação das concentrações (0,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L) de ANA e BAP e do tipo de explante mais responsivo à indução embriogênica foi realizado com segmentos nodais e foliares do acesso UMB, cultivados no escuro em meio MS ½ dos sais, 30 g/L de sacarose e 3g/L de Phytigel®. Aos 90 dias de cultivo os calos embriogênicos foram identificados e selecionados para a fase de maturação dos embriões somáticos sob estresse osmótico induzido por concentrações diferentes de Phytigel® (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 g/L), após 40 dias a massa (g), presença de pró-embriões (%) e embriões em maturação (%) foram avaliados. Para o ensaio final foram utilizados explantes foliares dos acessos UMB, SAL, JSA, SC e CER cultivados em meio MS ½ dos sais com as combinações de 4,0/4,0; 4,0/6,0 e 6,0/4,0 mg/L de ANA e BAP, para o estabelecimento da curva de crescimento durante os 60 dias iniciais de cultivo e aos 120 dias a presença de calos embriogênicos foi avaliada. A combinação 4,0/6,0 mg/L de ANA e BAP em explantes foliares proporcionou a formação de calos embriogênicos e pró-embriões no acesso UMB. Houve diferenças no comportamento entre acessos, com o SAL respondendo melhor à embriogênese. A curva de crescimento foi caracterizada pela presença das fases lag, exponencial e linear do desenvolvimento celular. Não houve maturação de embriões somáticos sob condições de estresse osmótico.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., Rubiaceae, Cultura de Tecidos de Plantas, Propagação.

4. ARTICLE 1

Title: INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN GENIPAP ACCESSIONS
Paper submitted (or to be submitted) to: Ciência Rural

ABSTRACT

The objective of this study was to induce and evaluate indirect somatic embryogenesis in genipap accessions. In a preliminary assay, concentrations (0.0; 4.0; 6.0 and 8.0 mg/L) of the growth regulators NNA and BAP were tested in all possible 16 combinations on two explant types (nodal and leaf segments of accession UMB) with regard to the capacity of embryogenic induction in the dark, in half strength Murashige and Skoog salts ($\frac{1}{2}$ MS) with 30 g/L sucrose and 3 g/L Phytigel®. After 90 days of culture, the embryogenic calli were identified and selected for the maturation phase of somatic embryos by osmotic stress induced by different Phytigel® concentrations (3.0; 5.0; 7.0 and 9.0 g/L). After 40 days, the weight (g), presence of pro-embryos (%) and maturing embryos (%) were evaluated. For the final test, leaf explants of the accessions UMB, SAL, JSA, SC and CER were used, cultivated in $\frac{1}{2}$ MS with NNA and BAP combinations of 4.0/4.0; 4.0/6.0 and 6.0/4.0 mg/L, respectively, to establish the growth curve during the initial 60 days of culture. After 120 days, the presence of embryogenic calli was evaluated. The NNA/BAP combination 4.0/6.0 mg/L induced the formation of embryogenic and pro-embryo calli in leaf explants of the UMB accession. The accessions differed and SAL performed better than the others with regard to embryogenesis. The growth curve was characterized by the presence of lag, exponential and linear phases of the cell development. Under osmotic stress, no maturation of somatic embryos was observed.

Keywords: *Genipa americana* L., Rubiaceae, Plant Tissue Culture, Propagation.

4.1. Introdução

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie nativa pertencente à família Rubiaceae e não endêmica do Brasil, ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2017). Essa espécie foi reconhecida entre dez prioridades muito altas pelo Programa Plantas do Futuro do CNPq/Banco Mundial/Global Environment Facility/Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Probio, com maior potencial de uso imediato entre árvores frutíferas nativas do Brasil (CORADIN et al., 2018).

É considerada uma espécie que une os pilares socioeconômicos e ambientais. Seus usos alimentícios, farmacológicos, têxteis e na construção civil movimentam grandes setores industriais. Sua importância cultural para os índios, que no passado utilizavam o fruto como fonte natural de corante, e importância ecológica por conta de suas características edafoclimáticas são destaques em projetos de recuperação de áreas degradadas e arborização urbana (BELLÉ, 2017).

Estratégias para preservar os seus recursos genéticos têm sido alvo de diversas instituições no país. A implantação do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros em 2009 abriu oportunidades para a conservação e estudos dos diferentes acessos presentes no BAG, assim como para a introdução da espécie no cultivo *in vitro*, visando a conservação do germoplasma e o melhoramento genético (SILVA et al., 2020).

A cultura de tecidos de plantas tem se tornado uma grande ferramenta para a agricultura, com múltiplas funcionalidades como a propagação e conservação de plantas, transformação genética, intercâmbio de germoplasma, entre outras. Entre as técnicas de propagação assexuada *in vitro*, a embriogênese somática é amplamente utilizada para espécies com potencial comercial como *Coffea arabica* (BARTOS, 2012), *Theobroma cacao* L. (RABELO, 2019), dentre outras.

A embriogênese somática é uma rota morfogênica de obtenção de plantas completas, sem a fusão de gametas, sendo capaz de ocorrer de forma direta, com embrião somático formado a partir do explante, ou indireta, com a etapa da calogênese, sendo considerada a mais promissora e de alta produtividade para as frutíferas (ANDRADE, 2014).

Os calos embriogênicos ou massas embriogênicas são células em estádios de diferenciação, que podem adquirir novas competências por meio de estresses provocados por fatores exógenos como reguladores de crescimento, sendo capazes de formar embriões somáticos em grandes quantidades, por ser um processo de alta frequência (SUGIMOTO et al., 2011; FREITAS, 2014). A indução dos calos embriogênicos e, posteriormente, dos embriões somáticos, está condicionada à escolha do genótipo, do tipo de explante, composição do meio de cultura, reguladores de crescimento e condições de cultura *in vitro*.

Todo protocolo de embriogênese somática é desenvolvido especificamente para a espécie, podendo ter como explantes raiz, embriões zigóticos, hipocótilos e foliares, ou seja, qualquer parte da planta que tenha uma boa capacidade de regeneração (BARRUETO, 2015). Além disso, indivíduos da mesma espécie podem apresentar respostas diferentes mesmo cultivados em condições iguais, sendo vital o estabelecimento do protocolo de propagação para genótipos com maior potencial embriogênico (LELJAK-LEVANIC et al., 2015). Para o estresse indutor das massas embriogênicas, reguladores de crescimento da classe das auxinas se fazem necessários, porém as concentrações requeridas para o sucesso *in vitro* variam muito entre as espécies (MIRANDA et al., 2019).

A maioria dos protocolos de regeneração *in vitro* para jenipapeiro foi estabelecida via organogênese, constatando-se que a espécie possui um bom potencial organogênico (YEE et al., 2010). Entretanto, o estabelecimento de protocolos de embriogênese somática ainda é desconhecido. Dessa forma, é imprescindível a formação de uma base de dados com melhores genótipos a serem utilizados, tipo de explante e concentrações dos reguladores de crescimento que viabilizem a técnica para a espécie. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos sobre a indução da embriogênese somática do jenipapeiro, analisando diferentes tipos

de explantes, acessos, concentrações de reguladores de crescimento e condições de cultura *in vitro*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Obtenção de plantas assépticas *in vitro* fonte de explantes

Como fonte de explantes foram utilizadas plântulas previamente estabelecidas *in vitro* de dois acessos do BAG Jenipapo da Embrapa Tabuleiros Costeiros: Núcleo Bandeirante (acesso CER 15°51'55.72"S; 47°57'34.59"W); Umbaúba, Sergipe (acesso UMB 11°22'34"S; 37°39'11"W) e Coronel João Sá, Bahia (acesso JSA 10°17'3"S; 37°55'37"W) e três populações naturais localizadas em São Félix, Bahia (acesso SC 12°40'0"S; 40°43'60"W); Salvaterra, Pará (acesso SAL 0°45'50.32"S; 48°30'40.44"W).

Para obtenção de plântulas assépticas, sementes obtidas de frutos maduros foram submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool 70% por 5 minutos, 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavadas três vezes em água estéril autoclavada. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em meio MS (Sigma-Aldrich, M5519) suplementado com 30 g/L de sacarose e gelificado com 3 g/L de Phytigel® (Sigma, P8169) (PEREIRA et al., 2007).

4.2.2. Ensaios de indução e multiplicação de calos embriogênicos (Ensaio preliminar)

Os calos foram induzidos a partir de segmentos foliares obtidos de plântulas estabelecidas *in vitro* do acesso UMB, como descrito anteriormente. Os segmentos foliares (0,5 cm²) e nodais (1 cm de comprimento) foram inoculados em placas de Petri de poliestireno estéreis (50x10 mm) contendo 20 mL de meio de cultura com metade da concentração de sais MS (½ MS) suplementado com 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de caseína hidrolisada, 400 mg/L de extrato de malte (BARTOS, 2012) e gelificado com 3 g/L de Phytigel®. Os foliares foram dispostos com a face adaxial em contato com o meio de cultura primário. Foram avaliadas diferentes combinações de ácido naftalenoacético-ANA (Sigma, N1145) (0,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L) e benzilaminopurina – BAP (Sigma, B3408) (0,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave a 120°C ± 1°C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas no escuro durante 90 dias em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 2°C e umidade relativa do ar média em torno de 70%. Aos 60 dias de cultivo foram transferidas para meio secundário (meio primário + 2,21 mg/L de 2,4-D isopenteniladenina -2,4-D) e aos 90 dias foram transferidas para fotoperíodo de 12 horas de luz com intensidade luminosa de 60 µmol/m²/s.

Aos 40 dias os calos foram classificados de acordo com sua coloração e textura em: tipo 1, caracterizado como compacto, de coloração amarelada, creme, aquoso, com crescimento regular, iniciando pelo bordo do explante, e tipo 2, com aspecto compacto, aquoso, esbranquiçado e com crescimento persistente competindo com os calos embriogênicos, conforme Bartos (2012). Para obtenção da porcentagem de calogênese (calos tipo 1 e 2), as culturas foram avaliadas por meio de uma escala de notas de 0 a 3, onde 0- sem presença de calos, 1- pouca indução de calos, 2-média indução de calos e 4- alta indução de calos (Figura 1). Aos 100 dias a presença de calos embriogênicos nas culturas foi avaliada com auxílio de Lupa Leica EZ4.

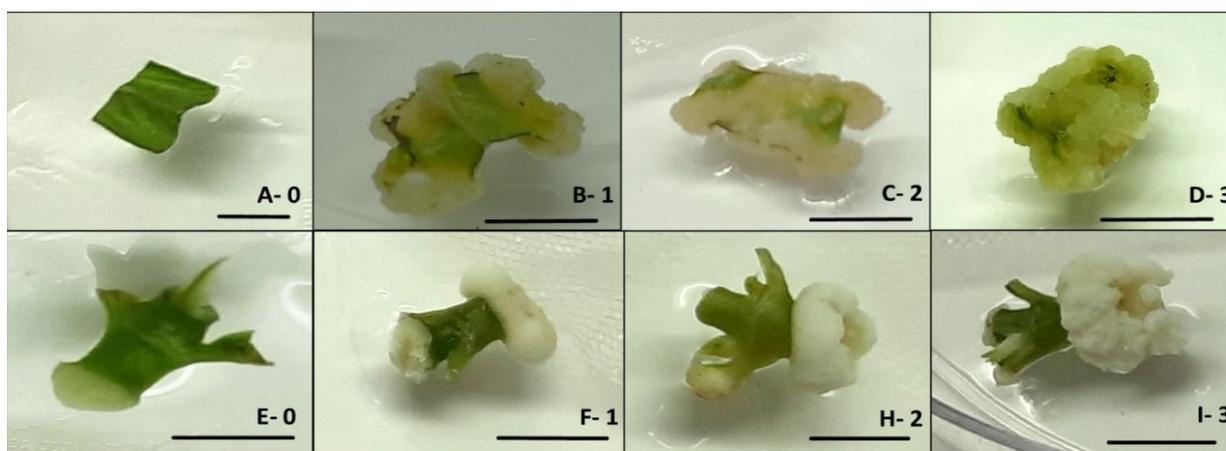


Figura 1. Classificação de calos tipo 1 (A-D) em explantes foliares e calos tipo 2 (E-I) em explantes nodais de *Genipa americana* L., onde: 0- Ausência de calos; 1- Baixa ou pouca presença de calos; 2- Média presença de calos; 3- Alta presença de calos. Barras: 0,5 cm (A); 1,0 cm (B, C, D, E, F, H, I).

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (ANA e BAP), com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de quatro placas de Petri com quatro explantes cada.

4.2.3. Efeito do ANA e BAP na indução de calos embriogênicos em acessos de jenipapeiro

Após seis meses de cultivo, as melhores combinações de reguladores de crescimento obtidas no ensaio preliminar item 4.2.2. (4,0 mg/L de BAP + 6,0 mg/L de ANA; 6,0 mg/L de BAP + 4,0 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP + 4,0 mg/L de ANA) foram aplicadas a amostras dos cinco genótipos de jenipapeiro, dois acessos do BAG: UMB (Umbaúba-SE) e CER (Núcleo Bandeirantes-DF) e três populações naturais: JSA (Coronel João Sá-BA), SC (São Félix-BA) e SAL (Salvaterra-PA), nas mesmas condições descritas anteriormente.

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 (acessos x combinações de ANA x BAP) e seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco placas de Petri com quatro explantes cada.

4.2.4. Estabelecimento da curva de crescimento de calos em acessos de jenipapeiro

A curva de crescimento cinético de calos oriundos do ensaio 4.2.3. foi determinada para os acessos UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA. Os calos foram pesados em balança de precisão de 0,001 gramas, na câmara de fluxo laminar, a partir do dia da inoculação (tempo 0), em intervalos de dez dias, durante 60 dias. Para cada tempo pesagem foram utilizadas três repetições por tratamento, com cada repetição constituída por uma placa de Petri com cinco calos. Em cada intervalo de tempo foi avaliada a presença das fases de crescimento lag (caracterizada pelo ganho ou não em número de células, estimado pela massa do calo, ou seja, quanto menor a massa do calo, maior a fase), fase exponencial (caracterizada por divisão celular intensa e aumento no número de células, porém células de tamanho pequeno com formação de agregados de células), fase linear (caracterizada por crescimento celular ativo e aumento da área celular), fase de desaceleração (caracterizada pela redução da divisão celular), fase estacionária (caracterizada pela ausência de divisão celular), conforme Paiva (2001). O percentual de crescimento dos calos foi determinado a partir do incremento da massa fresca considerando a massa inicial e a final em cada tempo de avaliação (MACHADO, 2018).

4.2.5. Ensaio de maturação e regeneração de embriões somáticos

Para maturação e regeneração dos embriões somáticos os calos embriogênicos do acesso UMB, previamente cultivados nos meios 6,0 mg/L de ANA + 6,0 mg/L BAP; e 6,0 mg/L ANA + 8,0 mg/L BAP), foram transferidos para meio líquido com metade dos sais do meio básico MS (½ MS) e 15,0 g/L de sacarose, sob agitação em mesa orbital com rotação de 100 rpm com as seguintes concentrações de ANA: 0; 0,5; 1,5 e 2,0 mg/L combinadas com Putrescina (Sigma, P7505): 0 e 4,57 g/L. Para tanto, foi inoculada a massa inicial de 20 mg de calo embriogênico em 20 mL de meio de cultura em tubo de ensaio que foram repicados a cada 20 dias durante 60 dias. As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas condições anteriores na ausência de luz. Os ensaios foram instalados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 x 2 (acessos x ANA x Putrescina), com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de três tubos de ensaio.

Após 50 dias da última repicagem, o material foi transferido para 20 ml de meio ½ MS, 15 g/L de sacarose com concentrações de ANA (0,0; 0,5; 1,5 e 2,0 mg/L) e BAP (6,0 mg/L) e gelificado com 3g/L de Phytigel®. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas por luz, temperatura de 25°C ± 2°C e umidade relativa do ar média em torno de 70%. Após 30 dias foram transferidas para 30 ml de meio ½ MS, suplementado com 20 g/L de sacarose, 100 ml/L de caseína, 400 mg/L de extrato de malte, 1 mg/L de AIB (Sigma, I5386) e 4,42 mg/L de 2,4-D (Supelco, 31518).

Para indução da maturação por estresse osmótico, após 30 dias as culturas foram transferidas para o mesmo meio com 4 concentrações de Phytigel® (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 g/L, modificado de VALENCIA-LOZANO et al., 2021) e após 40 dias foram avaliadas a porcentagem de incremento de massa do calo/cultura, presença de pró-embrião e de embriões maduros.

Os ensaios foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (concentrações de Phytigel®) e 10 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma placa de Petri com quatro calos.

4.2.6. Análises histológicas e citoquímicas

Aos 60 dias, as amostras de calos não embriogênicos e embriogênicos foram fixadas em formaldeído FAA (CASTRO et al., 2009) no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. As amostras foram transferidas para álcool 70%, 80%, 90% e 100%, em intervalos de 1 hora, para desidratação etílica. Posteriormente, as amostras foram infiltradas por Etanol 100% + resina líquida (1:1) durante 2 horas e, em seguida, em resina ativada = solução de infiltração (TECHNOVIT 7100) durante 24 horas na geladeira. Logo após, foi preparada a solução de inclusão, juntando o endurecedor à resina de infiltração ou resina ativada (segundo as proporções indicadas pelo fabricante). Os fragmentos vegetais infiltrados foram dispostos em histomoldes 6 x 8 mm da Leica® (formas plásticas, próprias para inclusão). No momento da inclusão, os fragmentos foram posicionados adequadamente. O processo de polimerização ocorreu em temperatura ambiente. Os blocos foram mantidos com baixa umidade, armazenados em recipientes com boa vedação e conteúdo sílica gel. Incluído o material, procedeu-se a microtomia utilizando o micrótomo rotativo semiautomático Slee Mainz®. Definindo-se a espessura de 6 µm, foram feitos os cortes que então foram estendidos sobre a lâmina contendo pequena quantidade de água. Após secagem em temperatura ambiente ou em chapa aquecedora, os meristemas apicais foram corados em azul de toluidina com pH 4,8 e lavados com água destilada.

As lâminas após a secagem foram fixadas com verniz vitral e, posteriormente, observadas em microscópio óptico (Zeiss/Jenamed2), onde foram realizadas as fotomicrografias (software AxioCam) das lâminas preparadas. Calos foram classificados como embriogênicos se apresentaram formas anatômicas semelhantes às células meristemáticas, de

tamanho pequeno, com citoplasma denso, paredes mais estreitas, núcleo grande central e nucléolos mais evidentes e formato celular isodiamétrico, vacúolos pequenos e fragmentados, com eventual presença de grão de amido localizado próximo ao núcleo. Os demais calos com a presença de células parenquimáticas alongadas, com amplos espaços intercelulares, núcleos poucos evidentes e vacúolos bem desenvolvidos foram classificados como não embriogênicos (BARTOS, 2012).

Para as análises citoquímicas, após 90 dias de cultivo, calos oriundos do ensaio item 4.2. foram selecionados aleatoriamente e, em seguida, submetidos à análise citoquímica para a visualização de pró-embrião somático. Dessa forma, 100 mg de calos foram corados com três a cinco gotas de azul de Evans (0,1%) por 3 minutos, após a retirada do excesso do corante, foi adicionado de três a cinco gotas de carmim acético (2%) durante 3 minutos (GUERRA, 1999). A visualização foi realizada em lupa LEICA EZ4 com aumento de 4 e 10 vezes.

4.2.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de significância. As médias de variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para variáveis quantitativas foram estimadas equações de regressão. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Ensaio de indução e multiplicação de calos embriogênicos no acesso UMB

A indução de calos foi iniciada aos 15 dias de cultivo, com intensa proliferação, sendo observada a calogênese em todos os tratamentos aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Em estudos com gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis, Rubiaceae), Farzinebrahimi (2012) também detectou a iniciação de calos em explantes foliares aos 15 dias de cultivo em meio MS ou WPM na presença de AIA e ANA.

As interações duplas entre o tipo de explante e os reguladores de crescimento ANA e BAP e entre ANA e BAP foram significativas para a indução de calos (Tabela 1). As notas variaram de 1,42 a 2,88.

Tabela 1. Indução de calos (notas) em explantes foliares e nodais de *Genipa americana* L. acesso UMB em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP aos 40 dias de cultura *in vitro*.

Tipo de explante	ANA (mg/L)				Equação de regressão
	0,0	4,0	6,0	8,0	
Foliar	1,42 B	2,88 A	2,50 A	2,71 A	$y = -0,0396^{***}x^2 + 0,4061^{**}x + 1,452^{**};$ $R^2 = 0,8901$
Nodal	2,46 A	2,79 A	2,83 A	2,83 A	$y = -0,0087^{**}x^2 + 0,1163^{ns}x + 2,4591^{ns};$ $R^2 = 0,9986$
BAP (mg/L)					
Foliar	2,00 B	2,58 A	2,12 B	2,79 A	-
Nodal	2,63 A	2,88 A	2,79 A	2,63 A	$y = -0,0151^{**}x^2 + 0,1202^{ns}x + 2,6275^{ns};$ $R^2 = 0,9948$

CV (%): 16,87

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão. Notas 0- Ausência de calos; 1- Pouca proliferação de calos; 2- Média proliferação de calos; 3- alta proliferação de calos.

Geralmente a indução de calos ocorre com o balanço hormonal entre uma auxina e citocinina (SKOOG; MILLER, 1957). A formação de calos na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura pode evidenciar uma alta concentração endógena de

hormônios em combinação com os componentes do meio utilizado (KARP, 1995). Relatos de Oliveira et al. (2018), em estudos com indução de calos em explantes foliares e nodais de jenipapeiro na presença de 4,0 mg/L de 2,4-D e 1,77 mg/L de BAP, apontaram que calos oriundos de segmentos foliares apresentaram o crescimento mais lento em relação aos de segmentos nodais. Esse fato também foi observado no presente estudo, com a indução de calogênese inferior em explantes foliares. Entretanto, em estudos com gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis, Rubiaceae), o melhor desenvolvimento de calos foi detectado em explantes foliares (GABER; BARAKAT, 2019).

A indução de calos em segmentos foliar e nodal na presença de ANA apresentou um comportamento quadrático. A mesma resposta foi observada em segmentos nodais na presença de BAP. O papel das auxinas no controle do desenvolvimento de embriões zigóticos tem sido alvo de estudos. Pesquisas têm demonstrado que a presença de uma auxina exógena causa um aumento no teor de auxina endógena durante o pré-tratamento de explantes de *Coffea canephora* (Rubiaceae) com ANA (AYIL-GUTIÉRREZ et al., 2013). Segundo Marquéz-Lopéz et al. (2018), os níveis de AIA aumentaram gradualmente durante o pré-tratamento de explantes foliares de *C. canephora* e na fase globular, sendo distribuída uniformemente em todas as células do embrião somático.

A indução de calos em relação à interação ANA X BAP obteve notas variando de 0,75 (ausência de reguladores) a 3, na presença de 4,0 e 6,0 mg/L de ANA (Tabela 2). As combinações do ANA e BAP apresentaram notas promissoras entre os intervalos de 2,5 a 3, uma vez que correspondem à média e alta calogênese, conforme escala de Bartos (2012). Todas as notas obtidas em meio de cultura MS com reguladores de crescimento em concentração acima de 4,0 mg/L foram satisfatórias, exceto para a combinação 6,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP (1,92). Provavelmente essa redução ocorre devido à oxidação nos explantes (Figura 2).

Tabela 2. Indução de calos (notas) em *Genipa americana* L. acesso UMB em meio de cultura MS com diferentes combinações de reguladores de crescimento ANA e BAP aos 40 dias de cultura *in vitro*.

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)				Equação de regressão
	0,0	4,0	6,0	8,0	
0,0	0,75	3,00	3,00	2,50	$y = -0,0838^{**}x^2 + 0,8858^{**}x + 0,7568^{**};$ $R^2 = 0,9985$
4,0	2,42	2,75	2,83	2,92	$y = -0,0048^{ns}x^2 + 0,0999^{ns}x + 2,4175^{**};$ $R^2 = 0,9982$
6,0	2,33	2,83	1,92	2,75	-
8,0	2,25	2,75	2,92	2,92	$y = -0,0114^{ns}x^2 + 0,1757^{ns}x + 2,247^{**};$ $R^2 = 0,9967$
$y = 0,1064^{**} + 0,194^{**}x;$ $R^2 = 0,6958$		$y = 0,0052^{ns}x^2 - 0,0688^{ns}x + 2,9917^{**};$ $R^2 = 0,8177$		-	$Y = -0,008^{ns}x^2 + 0,1084^{ns}x + 2,5159^{**}$ $R^2 = 0,7615$

CV (%): 16,87

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão. Notas 0- Ausência de calos; 1- Pouca proliferação de calos; 2- Média proliferação de calos; 3- alta proliferação de calos.

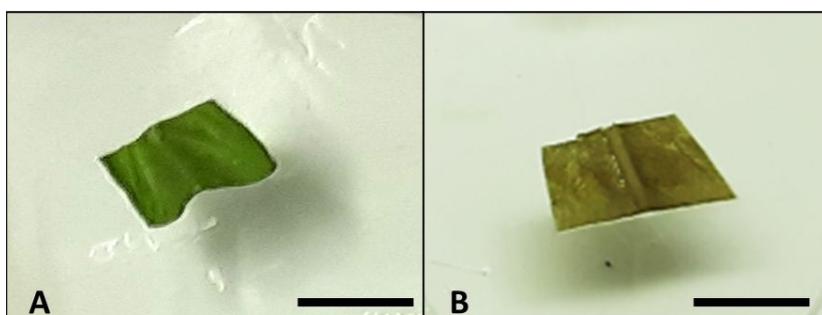


Figura 2. Segmento foliar de *Genipa americana* L. acesso UMB sem (A) e com (B) oxidação. Barra: 1 cm.

A combinação do ANA e BAP obteve resultados positivos em outras espécies para a indução de calos. Almeida et al., (2010), estudando a propagação *in vitro* de *Mussaenda enrythrophylla* cv. Rosea (Rubiaceae) a partir de segmentos de brácteas, observaram que na combinação de 4,0 mg/L de BAP e 0,4 mg/L de ANA houve 100% de indução de calos. Vásquez (2019) observou que 2,0 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de BAP proporcionou a indução de 62,5% de calos de segmentos foliares em *Durea macrophylla* Hurber (Rubiaceae). Gaber e Barakat (2019) constataram que a combinação de 0,25 mg/L de ANA e 1,0 mg/L de BAP favoreceu a multiplicação dos calos de segmentos nodais de *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). Auxinas associadas às citocininas estimulam a calogênese e, além disso, segundo Ślesak et al. (2017), as respostas estão associadas à fase de desenvolvimento dos explantes, indicando que a resposta morfo genética de um tecido *in vitro* depende da interação destas classes de reguladores.

Quanto ao tipo de calo, a indução do tipo 1 apresentou um comportamento quadrático em função da concentração de BAP isoladamente (Figura 3A). O mesmo tipo de indução foi constatado na presença de ANA com comportamento linear crescente para explantes foliares e quadrático para os segmentos nodais (Figura 3 B), com máximo de indução, 88,53%, na presença de 5,57 mg/L de ANA.

Para a indução de calos tipo 2, houve efeito significativo de todos os fatores e suas combinações, exceto para a interação entre tipo de explante e BAP. Para a interação tipo de explante e ANA constatou-se que segmentos foliares na ausência de ANA não desenvolveram calos tipo 2, apresentando comportamento oposto ao segmento nodal que obteve 100% de calos tipo 2. Na presença de ANA os dois explantes obtiveram percentual menor indução de calos tipo 2 na concentração de 6,0 mg/L com 37,5% em segmentos nodais e 25% em segmentos foliares (Figura 4).

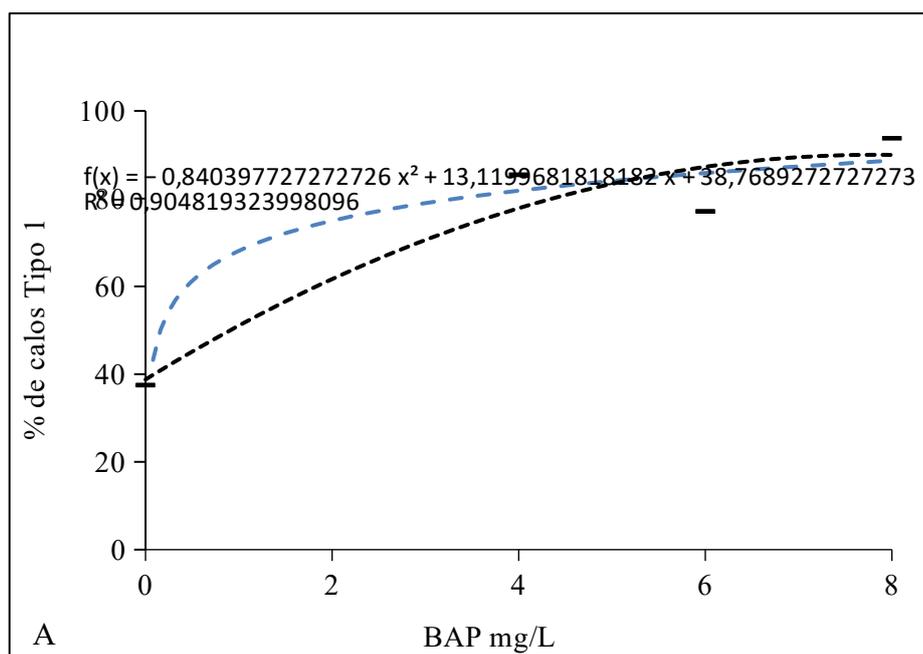


Figura 3. Resposta da indução de calos tipo 1 (%) em explantes nodais e foliares de *Genipa americana* L. cultivados em meio MS em função: A- concentração de BAP (mg/L); e B- da combinação tipo de explante e concentração de ANA (mg/L).

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão. Notas 0- Ausência de calos; 1- Pouca proliferação de calos; 2- Média proliferação de calos; 3- alta proliferação de calos.

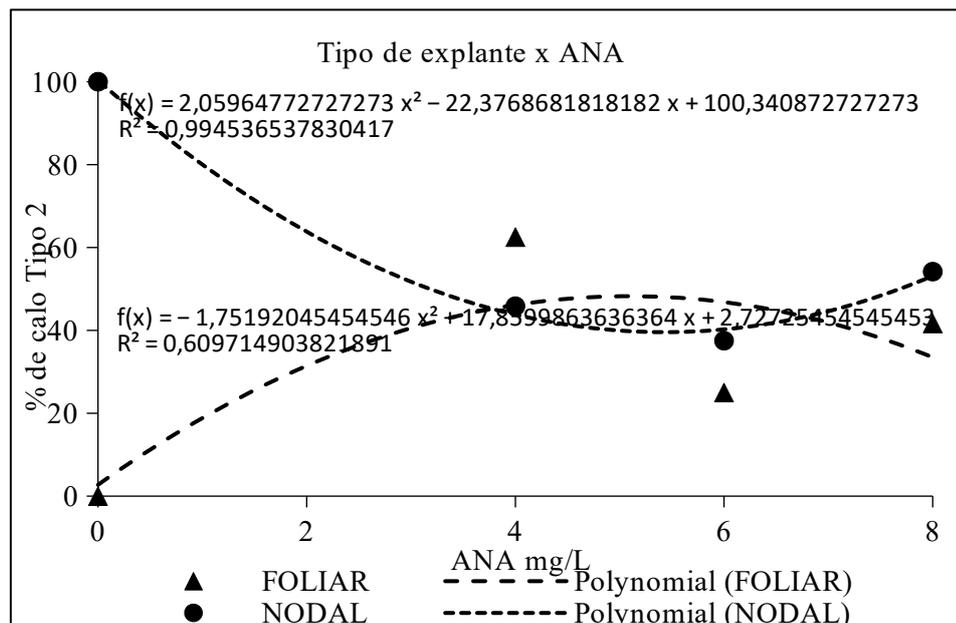


Figura 4. Resposta da indução de calos tipo 2 (%) em explantes foliares e nodais de *Genipa americana* L. cultivados em meio MS em função da concentração de ANA (mg/L).

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão.

A interação entre ANA e BAP mostrou que os maiores percentuais de calos tipo 2 ocorreram na ausência de BAP com concentrações 4,0 e 6,0 mg/L de ANA (100%), comportamento diferente do observado quando houve adição de BAP no meio de cultura. A presença de 6,0 mg/L de ANA com 4,0 e 8,0 mg/L de BAP inibiram a presença de calos tipo 2. Entretanto, na ausência de ANA o desenvolvimento foi constante (50%) para todas as concentrações de BAP (Tabela 3).

Tabela 3. Resposta da indução de calos tipo 2 (%) em explantes de *Genipa americana* L. cultivados em meio MS com diferentes combinações de ANA e BAP aos 40 dias de cultura *in vitro*.

ANA (mg/L)	Indução de calos Tipo 2 (%)				Equação de regressão	
	0,0	4,0	6,0	8,0		
0,0	50,00	50,00	50,00	50,00	-	
4,0	100,00	33,33	75,00	8,33	$y = -0,0473x^{2ms} - 8,9205x^{ns} + 95,682^{**}$; $R^2 = 0,5954$	
6,0	100,00	0	25,00	0	$y = 2,2727x^{2**} - 29,318x^{**} + 97,273^{**}$; $R^2 = 0,8782$	
8,0	75,00	91,67	8,33	16,67	$y = -1,5624x^2 + 3,1242x + 79,167^{**}$; $R^2 = 0,6321$	
Equação de regressão	$R^2 = 0,9967$	$y = -2,4148^{**}x^2 + 22,557^{**}x + 49,773^{**}$; $R^2 = 0,9967$	$R^2 = 0,6232$	$y = 3,5511^{**}x^2 - 25,133^{**}x + 53,864^{**}$; $R^2 = 0,6232$	$R^2 = 0,8197$	$y = -2,2255^{**}x^2 + 11,573^{**}x + 52,045^{**}$; $R^2 = 0,8197$
					$R^2 = 0,9842$	$y = 1,7045^{**}x^2 - 18,03^{**}x + 50,455^{**}$; $R^2 = 0,9842$

CV (%): 43,55

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão.

Há controvérsia entre os autores sobre qual tipo de calo apresenta mais potencial para o desenvolvimento de calos embriogênicos. Segundo Gorji et al. (2011), todos os dois tipos de calos são capazes de gerar embriões somáticos, mas o calo com características do tipo 2 é muito mais responsivo e com potencial altamente friável e embriogênico, com grande capacidade de multiplicação. Singh et al. (2015) e Silva et al. (2018) consideram calos friáveis de acordo com sua coloração branco translúcida ou amarelada, atributos esses, semelhantes aos calos tipo 1, que de acordo com a classificação de Bartos (2012) são compactos, de cor levemente amarelada a creme, aquoso e com crescimento regular. Bartos (2012) confirmou a assertividade da sua classificação quando induziu 90% de calos embriogênicos em café arábica var. Catuí vermelho, utilizando meio MS primário com 2,21 mg/L de 2,4-D e 2,0 mg/L de 2iP, gerando uma nota 3 para calos tipo 1 e a inibição completa de calos tipo 2. Gaber e Barakat (2019) observaram a formação de calos embriogênicos brancos e friáveis em 100% explantes foliares de gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis, Rubiaceae) em meio MS na presença de 2,4-D. Entretanto, variações na coloração e textura de calos oriundos de explantes foliares de *Gardenia latifolia* Ait. (Rubiaceae) foram detectadas em função da concentração de 2,4-D no meio de cultura (REDDY; SARITHA, 2012).

Para verificar qual tipo de calo seria mais responsivo para a embriogênese somática indireta em *G. americana* L., a presença de calos embriogênicos foi avaliada após 50 dias. O percentual de calos seguiu um modelo quadrático em função da concentração de BAP, com a indução variando de 4% a 89%, com ponto máximo de curva na concentração de 6,8 mg/L de BAP e 88,79% de indução dos calos embriogênicos (Figura 5).

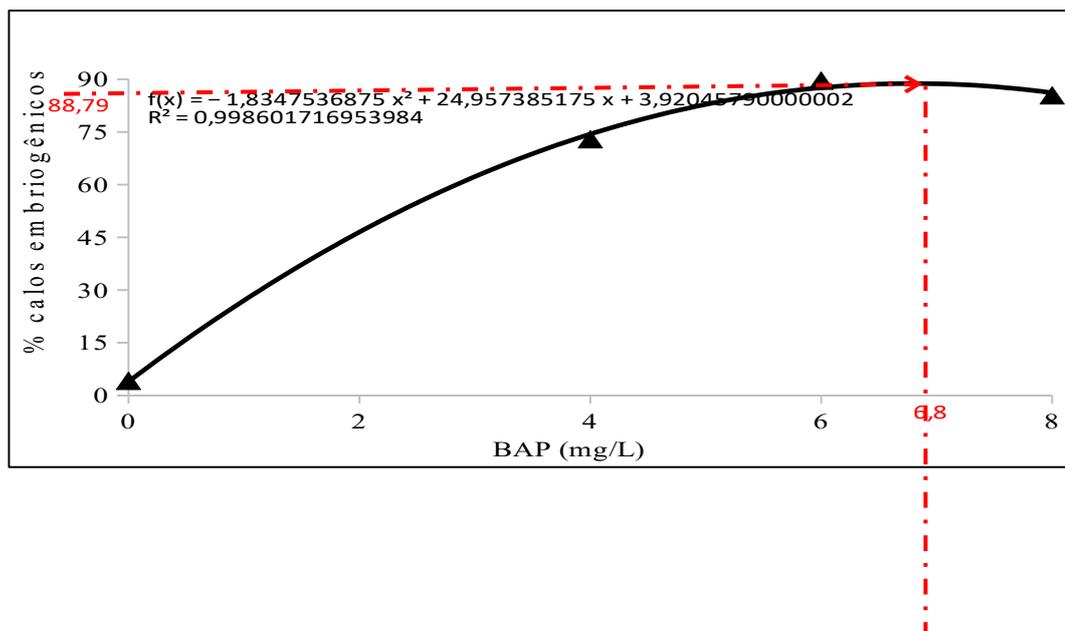


Figura 5. Resposta da indução de calos embriogênicos (%) em explantes de *Genipa americana* L. cultivados em meio MS em função da concentração de BAP (mg/L) aos 50 dias de cultura *in vitro*.

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão.

A formação de tecidos embriogênicos na presença de uma citocinina no meio de cultura já foi relatada como uma estratégia para a formação de embriões somáticos do café, espécie da mesma família do jenipapo (YASUDA et al., 1995). Porém, trabalhos mais recentes mostram que a ausência da auxina inibe a formação de calos embriogênicos e induz a geração de embriões somáticos de forma direta. Hott et al. (2009) relataram que em 80% explantes foliares de café conilon houve a indução direta de embriões somáticos torpedado na presença de 1,13 mg/L de BAP.

No presente trabalho, o regulador de crescimento ANA foi importante para o desenvolvimento de calos primários, entretanto não houve efeito para a formação de calos embriogênicos na primeira fase dos estudos. Provavelmente a capacidade embriogênica dos calos pode ser explicada pela mudança do meio primário para o secundário, na presença de 2,21 mg/L de 2,4-D, outra auxina. Por outro lado, Wu et al. (2017) apontam que as auxinas desempenham um papel crucial na coordenação da morfogênese e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos das plantas, particularmente na cascata de transdução de sinal que leva à reprogramação de padrões de expressão gênica anteriores à formação do embrião.

A embriogênese somática indireta é considerada um processo de alta frequência, ou seja, capaz de gerar grande quantidade de embriões e por isso durante seu desenvolvimento são utilizados vários tipos de meios para indução de calos, formação de calos embriogênicos, manutenção, maturação e regeneração embrionária (VAN BOXTEL et al., 1996). Os meios de indução de calos embriogênicos devem conter grandes concentrações de auxina para auxiliar na desdiferenciação das células e iniciar o processo indução embriogênica (PADUA et al., 2014; ALMEIDA, 2020). A combinação de 2,21 mg/L de 2,4-D e 2,15 mg/L de cinetina possibilitou a indução de 51% de calos embriogênicos nos explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Catuí Amarelo (SOUZA et al., 2015). Explantes radiculares de *Coffea arabica* cv. Catuí Vermelho IAC 81 desenvolveram entre 80 e 100% de calos embriogênicos com meio MS suplementado com 0,55 mg/L de 2,4-D e 1,08 mg/L de cinetina (ALVES et al., 2020).

Ao considerar os resultados de indução de calos tipos 1 e 2 com relação ao BAP, pode-se inferir que para o jenipapeiro, essa citocinina induz o desenvolvimento de calos tipo

1, que por sua vez, é mais responsivo ao processo de embriogênese. Com auxílio de uma lupa e câmera acoplada foram feitas observações visuais das características dos aglomerados de massas embriogênicas do jenipapo, que são compactos, amarelados, macios e com aspecto vítreo (Figura 6).

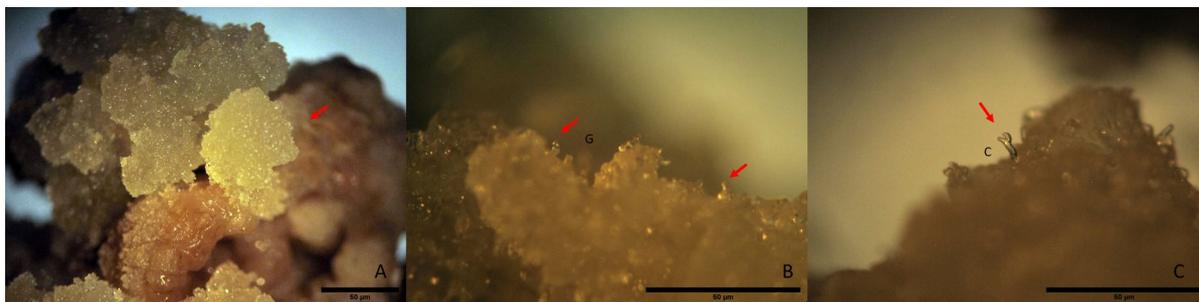


Figura 6. Calos embriogênicos de *Genipa americana* L. A- Calo embriogênico com meio $\frac{1}{2}$ MS dos sais suplementado de 6 mg/L de BAP com 4 mg/L de ANA. B- Embrião em formato globular (G) e formato coração (C) em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 6 mg/L de BAP e 4 mg/L de ANA. C- Embrião Somático em formato cotiledonar (C) em meio MS $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 8 mg/L de BAP. Barra: 50 μ m.

Os calos embriogênicos do jenipapo possuem características semelhantes ao de *Coffea arabica* L. Bartos (2012) os descreveu como de coloração amarelo intenso, com crescimento reduzido. Texeira et al. (2004) ainda relatou que em explantes foliares de café foram observados pontos de desenvolvimento de massas embriogênicas com textura granular, localizados em cima de calos primários tipo 1, processo similar ao que foi constatado no jenipapo (Figura 6 A).

A presença de pró-embriões, como são chamados os embriões globulares (Figura 6 B), também ocorreu aos 90 dias de cultivo em café arábica (BARTOS, 2012), estreitando ainda mais as semelhanças entre as duas espécies. O aparecimento dos pró-embriões indica que o processo de embriogênese somática indireta do jenipapeiro está pronto para o próximo ciclo, onde ocorre a maturação dos embriões e a regeneração das plantas (NOGUEIRA, 2013).

4.3.2. Efeito do ANA e BAP na indução de calos embriogênicos em acessos de jenipapeiro

Após 120 dias de cultivo, houve efeito significativo da interação entre acessos e combinação de ANA e BAP na formação de calos embriogênicos (Tabela 4). O acesso SAL, que obteve a menor variação de incremento (18-25%) de calo primário, foi o acesso onde a indução calos embriogênicos em duas combinações de reguladores foi de 100%. Esse resultado demonstra que o acesso SAL apresenta um desenvolvimento tardio, com sincronidade de produção baixa em relação aos demais acessos na fase de produção de calos primários. Entretanto, a etapa de indução de calos embriogênicos apresenta uma intensidade de produção superior aos demais. Segundo Rabelo (2019), o tempo de resposta morfogênica pode estar relacionado à composição fisiológica individual de cada acesso, se comportando de maneira diferente em relação a estresses abióticos e o desenvolvimento do material no meio.

O acesso UMB, no entanto, que obteve bons resultados no meio primário, nesta fase apresentou muitas culturas oxidadas nos meios M1 e M2, como pode ser constatado na Figura 7. A oxidação é considerada um dos sérios problemas enfrentados na cultura de tecidos de plantas. Quando ocorre, as culturas escurecem devido à liberação e oxidação compostos fenólicos prejudicando o crescimento do calo (CID et al., 2014). Oliveira (2012), trabalhando com diferentes genótipos de café, relatou que a oxidação é um dos principais caracteres a serem avaliados na taxa de multiplicação de calos embriogênicos. A partir de um determinado tempo de cultivo *in vitro*, os calos apresentam coloração creme escuro com baixas taxas de

conversão de embriões. De forma geral, a oxidação é influenciada pelo tipo de explante, genótipo, componentes no meio de cultura e condições de cultivos, podendo causar perdas no experimento devido à morte do explante (ANDRADE, 2014). A combinação de reguladores M2 foi a mais promissora, induzindo 100% de calos embriogênicos nos acessos JSA, SC e SAL. O acesso CER obteve a menor resposta dentre todos os acessos e em todas as combinações de reguladores testadas, evidenciando um baixo potencial embriogênico, uma vez que todos os acessos foram mantidos nas mesmas condições de cultivo.

Tabela 4. Presença de calos embriogênicos nos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de *Genipa americana* L. em meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP aos 120 dias de cultura *in vitro*.

Acessos	Formação de calos embriogênicos (%)		
	M1	M2	M3
UMB	0,00 bA	0,00 Ba	50,00 aA
JSA	25,00 bB	100,00 Aa	25,00 aB
SC	25,00 bB	100,00 aA	50,00 aAB
CER	0,00 bA	25,00 Ba	0,00 bA
SAL	100,00 aA	100,00 Aa	50,00 aA

CV (%): 84,27

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M1- 4,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; M2: 4,0 mg/L ANA e 6,0 mg/L BAP; M3: 6,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP. UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

Em estudos com genótipos elite de *Coffea arabica*, Rezende et al. (2011) observaram que a produção de embriões somáticos é fortemente dependente do genótipo. Bartos (2012) alcançou uma resposta semelhante quando analisou a influência de quatro genótipos de café na formação de calos embriogênicos (%). O autor constatou grande heterogeneidade nas respostas, com genótipos sem calos embriogênicos, com pouca presença de calos e com 100% de calos embriogênicos. Balgun et al. (2019) avaliaram a performance de quatro genótipos de café nigeriano na embriogênese somática e notaram que três genótipos responderam bem à embriogênese enquanto um não mostrou resposta satisfatória. -Ao analisar morfológicamente os calos (Figura 7), é possível identificar que os calos embriogênicos se desenvolveram em pontos acima dos calos primários, assim como foi observado no ensaio inicial (4.3.1) com o acesso UMB. O acesso CER exposto ao M2, apresentou calos característicos do tipo 2, com a coloração esbranquiçada, o qual competem e inibem os calos embriogênicos (BARTOS, 2012). Além do acesso UMB, o SC também apresentou oxidação, porém em menor intensidade, apenas em alguns calos na presença do M3.

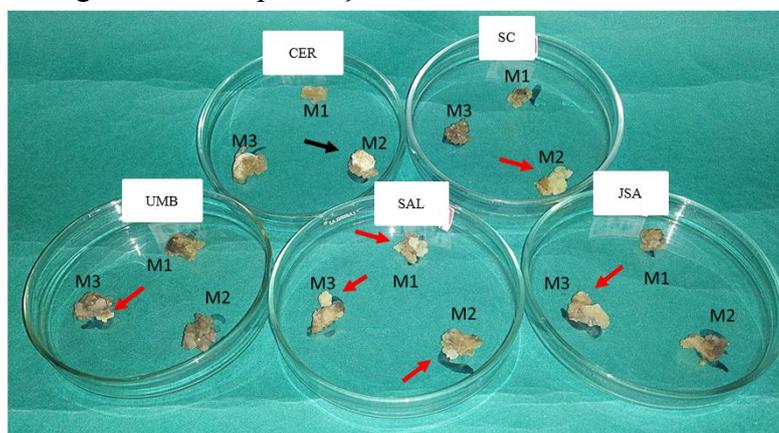


Figura 7. Calos foliares de diferentes acessos de *Genipa americana* L. cultivados com meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP.

M1- 4,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; M2: 4,0mg/L ANA e 6,0 mg/L BAP; M3: 6,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP. Setas vermelhas: Calos embriogênicos; seta preta: calos tipo 2. UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

Houve efeito significativo da interação entre os acessos de jenipapeiro e as combinações dos reguladores de crescimento para a massa fresca de calo (Tabela 5). O acesso SC mantido no meio M3 (6,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP) aos 30 dias o acesso UMB, aos 60 dias, no M2 (4,0 mg/L ANA e 6,0 mg/L BAP), foram superiores às demais interações. As médias das massas dos acessos diferiram estatisticamente. As observadas nos acessos UMB e JSA foram superiores aos demais, apresentando massa fresca de calos acima de 0,650 gramas em todas as combinações de reguladores, aos 60 dias de cultivo. O acesso SC alcançou essa massa apenas quando exposto ao M3 e os acessos CER e SAL não ultrapassaram 0,60 gramas em nenhuma das combinações de reguladores estudadas. Apesar do acesso SAL apresentar a menor média de massa fresca (0,54 g) cultivado no meio M1 (4,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP), o valor da massa foi o triplo quando comparado com o resultado obtido por Oliveira et al., (2018), que aos 60 dias de cultivo com meio suplementado de 2,0 mg/L de 2,4-D e 1,77 mg/L de BAP, obtiveram apenas 0,15 gramas. O acesso CER também apresentou uma resposta distinta ao observado anteriormente por Oliveira et al., (2018) quando cultivado com 2,0 mg/L de 2,4-D e 1,77 mg/L de BAP, acumulando uma média de massa fresca de 0,096 g, evidenciando a influência do regulador de crescimento no comportamento *in vitro* dos acessos.

Tabela 5. Massa fresca de calos (g) dos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de *Genipa americana* L. inoculados em meio MS suplementados com diferentes combinações de ANA e BAP aos 30 e 60 dias de cultura *in vitro*.

Acessos	Tempo (Dias)					
	30			60		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
UMB	0,37 aA	0,44 aA	0,35 abA	0,80 bcB	1,18 aA	0,66 abB
JSA	0,33 abA	0,24 bA	0,30 abA	0,93 Aa	0,70 bA	0,74 abA
SC	0,22 bcB	0,24 bB	0,38 aA	0,56 bcA	0,62 bcA	0,84 Aa
CER	0,25 bcA	0,21 bA	0,24 bcA	0,60 bcA	0,53 bcA	0,57 abA
SAL	0,19 cA	0,13 bA	0,13 cA	0,45 cA	0,31 Ca	0,42 bA
CV (%)	18,87			21,26		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M1- 4,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; M2: 4,0mg/L ANA e 6,0 mg/L BAP; M3: 6,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

O incremento da massa fresca também foi avaliado (Tabela 6) confirmando a maior resposta do acesso UMB no M2 com incremento de 74,14%, seguido do JSA com 60,22% no M1. Os demais acessos, no entanto, não alcançaram 50% de incremento de massa fresca em todos as combinações de reguladores testadas. O tratamento M2 proporcionou a maior variação de incremento nos acessos, de 18 a 74%, depois o M1 com incremento entre 25 e 60% e com menor variação o M3 com 25% a 46%, onde os acessos não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 6. Incremento da massa fresca de calos (%) dos acessos UMB, JSA, SC, CER e SAL de *Genipa americana* L. no intervalo de tempo dos 30 dias aos 60 dias de cultura em meio MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP.

Acesso	Incremento (%)		
	M1	M2	M3
UMB	25	74,14	25
JSA	60,22	25	25
SC	25	25	25
CER	25	25	25
SAL	25	25	25

s			
UMB	42,83 abB	74,14 aA	31,69 Ab
JSA	60,22 Aa	45,90 bA	43,62 aA
SC	33,56 Ba	38,81 abA	46,07 aA
CER	35,42 abA	31,99 abA	32,82 aA
SAL	25,75 Ba	18,00 bA	25,46 aA

CV (%): 27,09

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M1- 4,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; M2: 4,0mg/L ANA e 6,0 mg/L BAP; M3: 6,0 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP; UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

As metodologias para induzir a embriogênese somática e o desenvolvimento dos embriões são dependentes de genótipo, o que leva a um desenvolvimento quase empírico de protocolos específicos para cada cultivar ou clone (CAMPOS et al., 2017). Trata-se de uma limitação séria e exclui uma compreensão abrangente geral do processo como um todo. Como neste estudo os fatores externos e as características fisiológicas foram controladas, a diferença nas médias apresentadas evidenciam a influência dos genótipos entre os acessos. Conforme relatos de Andrade (2014), o controle genético na etapa da calogênese é muito elevado e recomenda-se estudos de acessos individualmente para uma análise mais completa da capacidade da formação de calos e posteriormente a formação de embriões somáticos da espécie.

Silva et al. (2014) estudaram a diversidade genética de acessos brasileiros de jenipapeiro e observaram que os acessos do estado da Bahia são geneticamente próximos aos de Sergipe. Apesar da proximidade genética, neste trabalho é notado que os acessos UMB (Umbaúba-SE), JSA (Coronel João Sá-Bahia) e SC (São Félix-Bahia) apresentaram comportamento distintos ao serem expostos a combinações de reguladores diferentes.

Considerando esses aspectos, Nascimento (2018) recomenda que a partir de um estabelecimento de protocolo de embriogênese somática abrangendo todos os constituintes do meio de cultura, são de extrema importância os estudos genéticos que viabilizem a escolha do melhor genótipo associado a este meio de cultura. O comportamento dos acessos de jenipapeiro na fase de calogênese primária é importante para formar uma base de dados que servem no desenvolvimento de novas metodologias para conservação do germoplasma e na escolha do material genético adequado em programas de melhoramento genético.

4.3.3. Curva de crescimento de calos

Os padrões do crescimento dos calos foram estabelecidos em segmentos foliares dos cinco acessos (UMB, SAL, JSA, CER e SC) em estudo. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram induzidos em três combinações dos reguladores ANA e BAP (M1- 4,0 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP; M2- 4,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP e M3- 6,0 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP) (Figura 8).

De maneira geral, foi observado um crescimento linear dos calos, com tendência de aumento da massa fresca de acordo com a evolução do tempo. Houve diferença na massa fresca do calo em todos os acessos. O acesso UMB foi superior em todas as combinações de reguladores testadas, principalmente na presença de 4,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP, com incremento de 1,7 g aos 60 dias.

A curva de crescimento é composta por cinco fases: *lag* (I), exponencial (II), linear (III), desaceleração (IV) e estacionária (V) (CHIAVEGATTO et al., 2015). Neste trabalho foram observadas as fases I, II e III. A fase I ocorreu do 10° ao 20° dia, a II do 20° ao 50° dia

de cultivo *in vitro* nos acessos UMB, JSA e SC e aos 60 dias no CER e SAL. A fase III foi detectada apenas nos acessos UMB, JSA e SC do 50° ao 60° dia.

Os acessos SAL e CER apresentaram respostas distintas quando comparados com os estudos de Oliveira *et al.* (2018). Os autores observaram as três fases na curva de crescimento de calos utilizando explantes foliares e um meio suplementado de 2,0 mg/L de 2,4-D e 1,77 mg/L de BAP, a fase lag aconteceu mais cedo (até 10° dia) e a exponencial durou o mesmo número de dias (10° aos 50 dias), porém houve a presença da fase linear que correspondeu ao intervalo do 50° aos 60 dias após a inoculação. Esse comportamento *in vitro* diferenciado ratifica que o crescimento dos calos é influenciado por reguladores exógenos uma vez que os mesmos acessos, tipos de explantes, período de cultivo apresentaram um desenvolvimento diferenciado

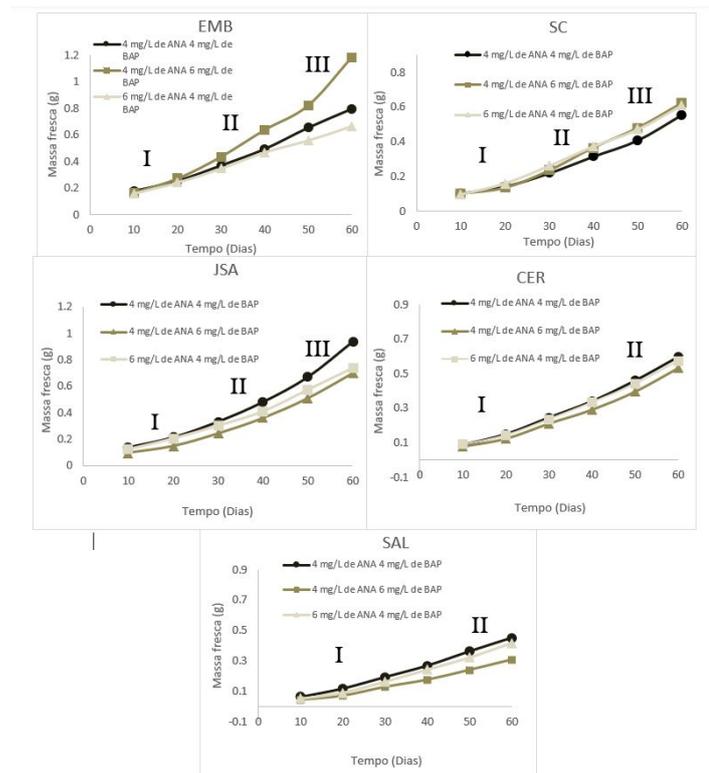


Figura 8. Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos foliares dos acessos UMB, SC, CER, JSA e SAL (♦) inoculados em meio MS suplementados com diferentes combinações de ANA e BAP. M1-4,0 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP(■); M2- 4,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP (▲); M3- 6,0 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP (●) durante 60 dias. I- fase lag; II- fase exponencial; III- fase linear. UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA,CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

Os resultados de crescimento cinético do presente estudo corroboram com os obtidos por Machado (2018) em explantes foliares de *Hancornia speciosa* (mangabeira, Apocinaceae), inoculados em meio MS na presença de 2,4-D (10,0 mg/L) e BAP (5,0 mg/L), e por Mwaniki et al. (2019) em genótipos de *Coffea arabica*, com a indicação de apenas três fases distintas a lag, exponencial e linear. Em comparação ao tempo de desenvolvimento celular, o jenipapeiro pode ser considerado de crescimento lento. Entretanto, em estudos com indução de calos em explantes foliares de *Coffea canephora* cv. Conilon, Santos et al. (2010) observaram uma sigmoide com as 5 fases estabelecidas em 60 dias na presença de AIB (2,74 mg/L), 2,4-D (4,42 mg/L) e 2iP (2,03 mg/L). Rodrigues et al., (2022), com calos de explantes cotiledonares de *Enterolobium contortisiliquum* (Tamboril, Fabaceae) em meio MS suplementado com 0,5 mg/L de 2,4-D; 2,0 mg/L de picloram, 0,5 mg/L de cinetina e 2,0 mg/L de BAP, visualizaram as cinco fases da curva de crescimento aos 84 dias de cultivo, com a

fase de desaceleração sendo observada já aos 28 dias. Silva et al. (2020) estudaram a curva de crescimento de calos em explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira, Anacardiaceae) e observaram as cinco fases distintas aos 60 dias de cultivo.

A determinação da curva de crescimento de calos é de extrema importância para entender as fases de desenvolvimento dos calos para trabalhos futuros de indução e multiplicação. Este resultado mostra que é preciso mais tempo de avaliação para a análise das cinco fases do crescimento cinético.

4.3.4 Análises citoquímicas e histológicas

O teste citoquímico dos acessos com os corantes azul de Evans 0,1% e carmin acético 2%, e a reação positiva das células ao corante vermelho, confirmou a presença de células pró-embriogênicas nos calos dos acessos SAL e SC nas três combinações de reguladores testadas e no acesso JSA na combinação M3 (Figura 9). As células coradas em azul e não coradas, correspondem às células não embriogênicas, encontradas em grande quantidade nos acessos UMB e CER em todas as combinações de reguladores testadas. É possível observar a presença de calos com a coloração azul e vermelho, indicando a presença de células tanto embriogênicas como não embriogênicas no mesmo material.

De acordo com Lopes et al. (2016), massas calosas e pró-embriônicas reagem vigorosamente ao carmin acético e fracamente ao azul de Evans, e para Steiner et al. (2005) a reação positiva do carmin acético está ligada à competência da célula para o desenvolvimento celular.

O teste citoquímico com a dupla de corantes é amplamente utilizado em vários estudos de potencial embriogênico. Silva (2009) identificou qual subcultivo de calos de *Byrsonima intermedia* A. Juss seria mais eficiente para reforçar o potencial embriogênico da espécie a partir da porcentagem de coloração do carmin acético. Santos et al. (2015) verificaram em resposta ao teste citoquímico que a calogênese de *Jatropha curcas* L. (pinhão manso, Euforbiaceae) é otimizada com MS suplementado 4,52 mg/L de 2,4-D e 2,22 mg/L de BAP e induzem um potencial embriogênico na espécie.

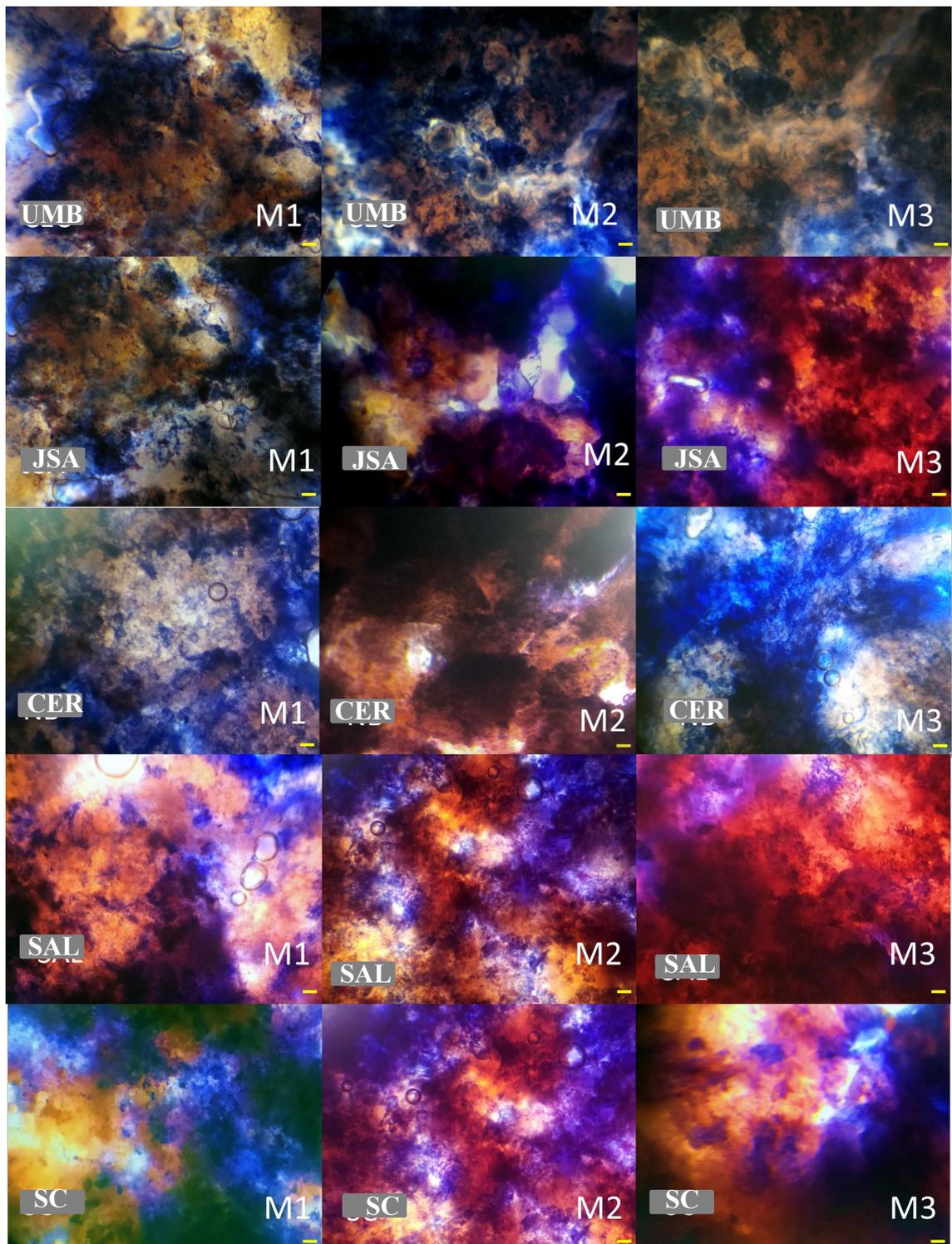


Figura 9. Análise com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos a partir de explantes foliares de cinco acessos de *Genipa americana* L. (UMB, JSA, CER, SAL e SC) cultivados em MS suplementado com diferentes combinações de ANA e BAP. M1: 4,0 ANA 4,0 BAP; M2: 4,0 ANA 6,0 BAP; M3: 6,0 ANA 4,0 BAP. Barra: 100 μ m. * Aglomerados de células de um calo de cada acesso. UMB-Umbaúba-SE, JSA-Coronel João Sá-BA, CER-Núcleo Bandeirante-DF, SC-São Félix-BA e SAL-Salvaterra-PA.

Além da coloração avermelhada reativa ao carmim acético, para as células serem classificadas como pró-embriogênicas devem ser agrupadas, redondas, pequenas, com citoplasma denso, de formato isodiamétrico, como pode ser visto nos aglomerados de células da Figura 10. Entretanto, Marques (2021), avaliando o potencial embriogênico de jequitibá rosa em meio com diferentes concentrações de BAP e cinetina, observou que apesar das

células serem reativas ao carmim acético, a maioria apresentou formato alongado, sem características embriogênicas. Após a confirmação do teste citoquímico e identificação das características embriogênicas, os acessos foram testados para a capacidade de conversão das massas embriogênicas em embriões somáticos maduros.

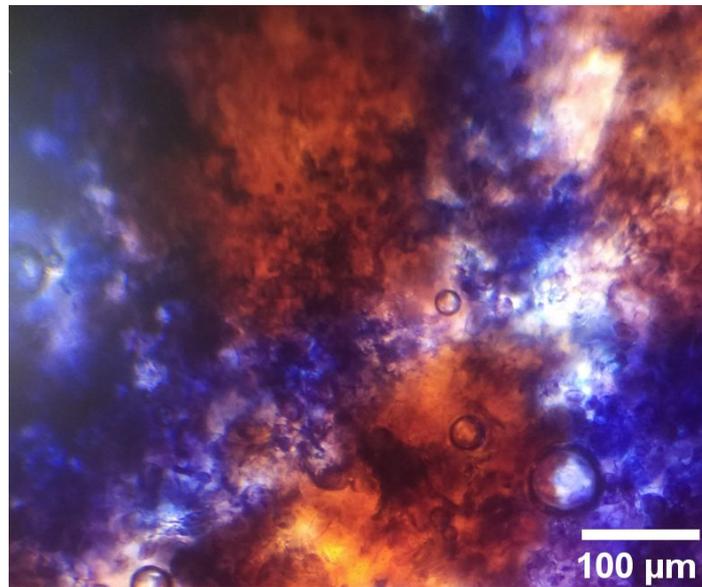


Figura 10. Calos foliares de *Genipa americana* L. do acesso SAL cultivados em meio MS suplementado com 4,0 mg/L de ANA e 6,0 mg/L de BAP. Barra: 100 μ m.

4.3.5. Maturação de embriões somáticos

Vários agentes podem ser utilizados para induzir a maturação dos embriões somáticos, como pequenas concentrações de auxinas, altas concentrações de citocininas, carboidratos, aminoácidos e muito mais (ASLAM et al., 2011). O processo de maturação neste trabalho ocorreu em várias etapas, primeiramente na presença de baixas concentrações da auxina ANA (entre 0,0 e 2 mg/L) e putrescina (0 e 4,57 g/L) em meio líquido. Após os 60 dias de cultivo foi observada a formação de uma estrutura desconhecida nos tratamentos sem putrescina com características de formato alongado, maleável, esbranquiçadas e preenchendo toda a extensão dos calos (Figura 11). Estrutura bastante semelhante a micélios de fungos, porém não houve outras evidências que comprovassem a contaminação fúngica como meio de cultura turgido e micélios agrupados flutuando no meio de cultura (TORTORA et al., 2017).

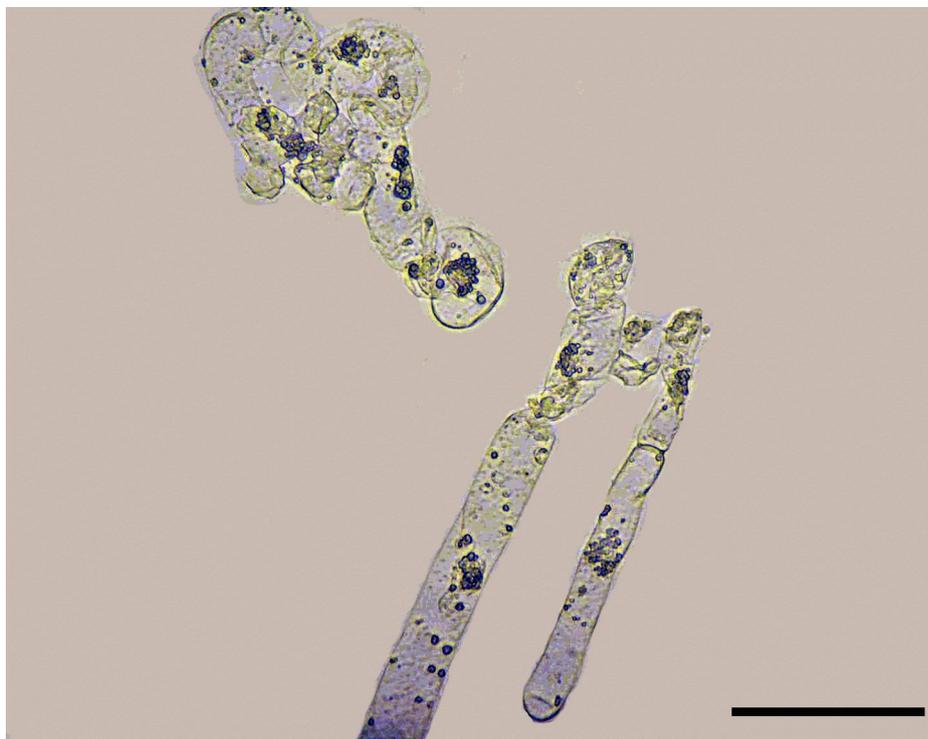


Figura 11. Estruturas observadas em calos do acesso UMB de *Genipa americana* L. cultivados em meio MS com diferentes concentrações de ANA (0; 0,5; 1,5 e 2,0 mg/L) sem putrescina. Barra: 50 μ m.

Já os tratamentos com putrescina não apresentaram essas estruturas e não obtiveram mudanças significativas desde o início do ensaio, dessa maneira, foi realizada a troca de meios para meio MS gelificado, com 6,0 mg/L de BAP para o tratamento sem putrescina e 8,0 mg/L de BAP para o tratamento com 4,57 g/L de putrescina.

Como pode ser observado na Figura 12, os tratamentos com 6,0 mg/L de BAP, anteriormente sem putrescina, se desenvolveram sem interferência negativa das estruturas advindas, já os tratamentos com 8 mg/L de BAP, com adição putrescina, não evoluíram e apresentaram vários casos de oxidação. Por mais que a oxidação seja descrita na literatura como indício para regeneração dos embriões (MONACO et al., 1977), neste caso, o desenvolvimento dos calos foi estagnado. Bartos (2012), também relatou inúmeros casos de oxidação em calos embriogênicos de café arábica aos 30 dias de cultivo, na presença de luz, em meio de regeneração composto por 2,0 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de ANA, além da formação de embriões em quantidades reduzidas.

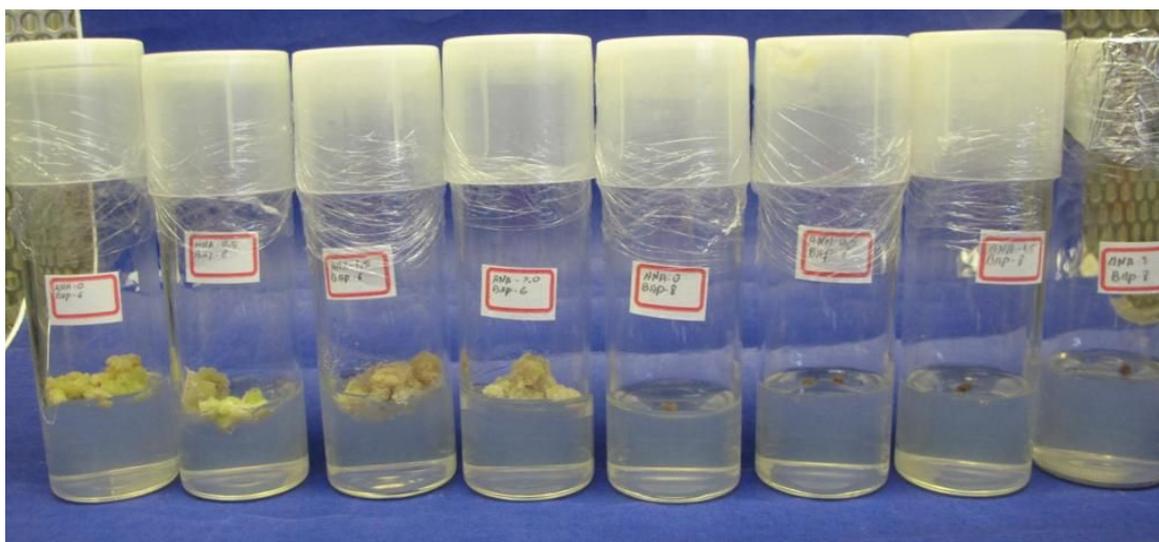


Figura 12. Calos de *Genipa americana* L. expostos a meio MS com diferentes concentrações de ANA (0; 0,5; 1,5 e 2,0 mg/L) e BAP (6,0 e 8,0 mg/L).

Aos 30 dias, a cultura de calos nos tratamentos com 6,0 mg/L de BAP foi selecionada para o ensaio da maturação com estresse osmótico a partir das concentrações de phytigel®. A utilização de diferentes concentrações do Phytigel® para a maturação dos embriões não foi significativa para as variáveis analisadas, não promovendo embriões maduros até avaliação (Tabela 7). Entretanto, o comportamento dos embriões em pré-maturação foi inversamente proporcional às concentrações de Phytigel®, ou seja, à medida que a concentração do Phytigel® aumentou, a presença dos embriões somáticos em pré-maturação foi menor em valores numéricos. Este resultado difere do observado por Valencia-Lozano et al., (2021) em *Coffea arabica* L. em estudos de indução da maturação dos embriões somáticos também por meio do estresse osmótico, onde em meio gelificado com 9 g/L de Gelerite® houve 83,7% de embriões somáticos.

Tabela 7. Massa (g), presença de pró-embrião (%) e de embriões em pré-maturação (%) de calos embriogênicos de *Genipa americana* L. na presença de diferentes concentrações de Phytigel®.

Phytigel® (g/L)	Massa (g)	Pró-embrião (%)	Embrião pré-maturação (%)
3	1,27	100,00	45,00
5	1,24	85,00	22,50
7	1,10	95,00	17,50
9	0,93	87,50	7,50
Equação de regressão	$y = -0,0105x^{2ns} + 0,0669x^{ns} + 1,1734^{**}$ $R^2 = 0,9848$	-	$y = -5,875x^{ns} + 58,375^{**}$ $R^2 = 0,9147$
CV (%)	27,58	22,45	

** coeficiente altamente significativo ($p < 0,01$), * significativo ($p < 0,05$) e ns não significativo ($p > 0,05$) pela análise de regressão.

Ainda segundo Valencia-Lozano et al., (2021), para a maturação dos embriões somáticos, o estresse osmótico e presença de citocininas são necessárias a fim de simular os processos que ocorrem naturalmente no desenvolvimento embrionário em sementes.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foi detectada a presença de calos embriogênicos e pró-embriões em abundância (Figura 13 A-C) e, aos 40 dias, a maturação de embriões globulares, de coloração bege e amarronzada, e alguns com aparência vítrea (Figura 13 D-J), evidenciando o início do processo de maturação.

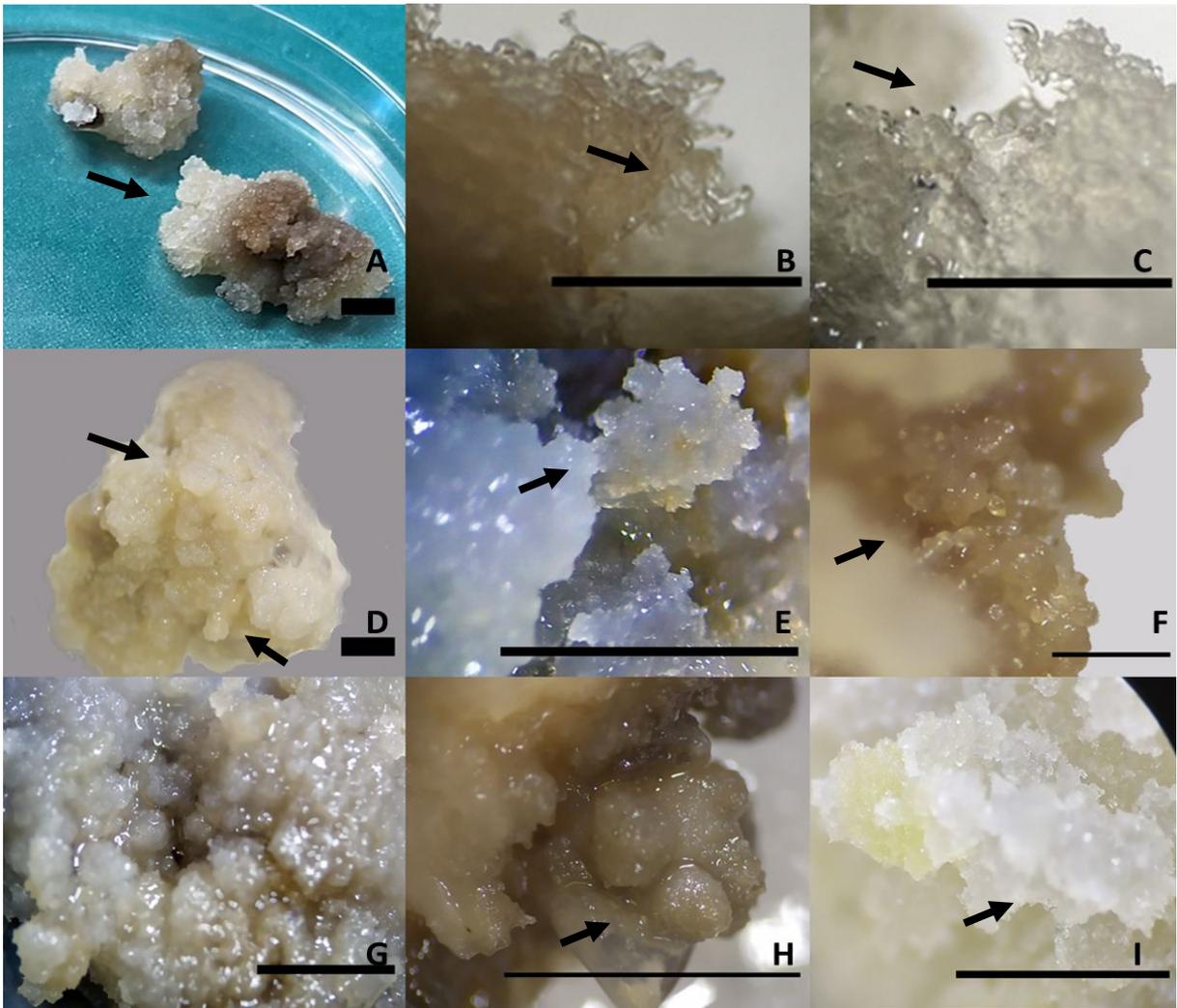


Figura 13. Calos embriogênicos, pró-embriões e embriões somáticos iniciando a maturação de *Genipa americana* L. 11-A-C: Calos embriogênicos e pró-embriões aos 30 dias de cultura no meio MS suplementado com 5% de Phytigel®. 11-D e I: Calos com presença de embriões globulares de coloração bege. 11 E-F: Embriões globulares com aparência vítrea. 11 G-H: Início da diferenciação de embriões globulares de coloração amarronzada. Barras A, D, G e F: 50 µm; Barras: B, C, E, H e I: 10µm.

Pode-se inferir que a maturação do jenipapeiro nestas condições é mais tardia quando comparada à maturação do café. Santos et al., (2020), em estudos com clone de *Coffea canephora*, verificaram que a formação de pró-embriões ocorreu aos 56 dias e a sua maturação em embriões cotiledonares aos 82 dias de cultivo *in vitro*. Já a maturação do *Coffea arabica* cv. Catiguá ocorreu aos 60 dias de cultivo em meio de maturação, na presença de 30% de embriões cotiledonares (RIBEIRO, 2014). No presente trabalho, até os 180 dias de cultivo *in vitro* não foi detectada a presença de embriões somáticos em estágio avançado de maturação nos diferentes acessos. Este fato pode estar associado à presença de 2,4-D no meio de cultura que dificulta o desenvolvimento embrionário e sua conversão em planta (ZAVATTIERI et al., 2011), a troca repetitiva de meios e a presença da luz na etapa da maturação. Bartos (2012) identificou que o cultivo de embriões de café arábica no escuro na fase da maturação foi mais eficaz, com cerca de 22,83 embriões/g quando comparado com o cultivo na luz com 13,35 embriões/g.

A maturação é considerada uma etapa crítica da embriogênese somática, apenas embriões maduros com uma morfologia normal, com acúmulo de reservas suficientes, são capazes de se converter em plantas normais. Nas condições do presente estudo a maturação

não foi satisfatória, sendo indispensável novas estratégias para solucionar os entraves dessa etapa para o jenipapeiro.

4.5. Conclusões

A combinação de 6,0 mg/L de BAP com 4,0 mg/L de ANA é promissora para a indução de calos primários;

A utilização de 2,4-D é benéfica na indução de calos embriogênicos de *Genipa americana* L.;

Os acessos de *Genipa americana* L. possuem potencial embriogênico distintos, sendo o acesso SAL a melhor opção para protocolos de embriogênese somática indireta, porém é importante aprimorar o protocolo para uma maior produção de calos primários para, consequentemente, aumentar a sua formação de calos embriogênicos;

O acesso CER pode ser considerado um genótipo inferior aos demais pelo baixo potencial embriogênico nas combinações de reguladores testadas;

São necessárias investigações posteriores para ajustes no meio e cultura a fim de reduzir a oxidação no acesso UMB, pelo alto potencial embriogênico;

A análise citoquímica confirmou a presença de células embriogênicas nos acessos SAL, SC e JSA;

O jenipapeiro possui um desenvolvimento celular lento, necessitando de avaliações mais longas para caracterizar as cinco fases da sua curva cinética de crescimento;

A maturação dos embriões somáticos do jenipapeiro deve ser otimizada para um resultado mais promissor, além da investigação sobre a estrutura desconhecida presente na cultura sem putrescina.

4.6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J. A. S. Observations on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. **IntechOpen- Open Science Open Minds**, p. 170, 2020.

ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; OLIVEIRA, A. B.; HERNANDEZ, F. F. F. Propagação *in vitro* de mussaenda (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 2, p. 206–212, 2010.

ALVES, I. S.; NEOFITI, W. C. F.; CARMAZINI, V. C. B.; ALMEIDA, J. A. S. Indirect and direct somatic embryogenesis in root explant of the *Coffea arabica* L. (RUBIACEAE), **Revista de Biologia Neotropical**, v. 17, n. 2, p.157-161, 2020.

ANDRADE, A. P. S. **Propagação clonal da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) via embriogênese somática e estimação de parâmetros genéticos relacionados à fase de indução da calogênese *in vitro***. 2014. 63f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014.

ASLAM, J.; KHAN, S.A.; CHERUTH, A.J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.18, n. 4, p. 369-380, 2011.

AYIL-GUTIÉRREZ B. A.; GALAZ-ÁVALOS R. M.; PEÑA-CABRERA, E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, e26998, 2013.

BALGUN, S. T.; OSUNDINA, M. A.; MUYIWA, A. A.; ANAGBOGU, C. F.; OGUNDEJI, B. A.; ORIMOGUNJE, O. A.; BABA-NITSA, M.; OLORUNMOTA, R. T. Performance of coffee leaf explants in somatic embryogenesis. **Nigerian Agricultural Journal**, v. 50, n. 2, p. 10-17, 2019.

BARRUETO, C. L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 4ª ed, 2015. p. 325.

BARTOS, P. M. C. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

BELLÉ, A. S. **Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) para imobilização de enzimas**. 2017. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2017.

CAMPOS, N. A.; PANIS, B.; CARPENTIER, S. C. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1460, 2017.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009.

CHIAVEGATTO, R. B.; CASTRO, A. H. F.; MARÇAL, M. G.; PÁDUA, M. S.; ALVES, E.; TECHIO, V. H. Cell Viability, mitotic index and callus morphology of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). **Tropical Plant Biology**, v. 8, p. 87-97, 2015.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. Ed. Brasília, DF: Embrapa, p.15-49, 2014.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F.G.C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, (Série Biodiversidade; 51), 2018.

FARZINEBRAHIMI, R. **Tissue culture and biological activities of *Gardenia jamioides* Ellis**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) - University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. **Brazilian Journal of Biometry**, v. 37, n. 4, p.529-535, 2019.

FLORA DO BRASIL. Rubiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19419>. Acesso em: 08 abr. 2022.

FREITAS, E. O. **Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo açazeiro (*Eutrope oleracea* Mart.)**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2014.

GABER, K.; BARAKAT, A. Micropropagation and somatic embryogenesis induction of *Gardenia jasminoides* plants. **Alexandria Science Exchange Journal**, v. 40, p. 190-202. 2019.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. **In vitro plant Generation of tropical maize genotypes**. In: International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology, Singapura, v. 16, p.52-59, 2011.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- CBAB. v. 2, p. 533-568, 1999.

HOTT, M. O.; NOGUEIRA, E. U.; LIMA, A. B. P.; TOMAZ, M. A.; RIVA, E. M. Indução de embriogênese somática em clones do café conilon (*Coffea canefora* Pierre ex Froncher). In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, n. 5, 2009, Guarapari. O melhoramento e os novos cenários da agricultura: **Anais...** Vitória, 2009.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v. 85, p.295-302, 1995.

LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIĆ, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p.1-14, 2015.

LOPES, C. A.; DIAS, G. M. G.; PIO, L. A. S.; SILVEIRA, F. A.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p.21-25, 2016.

MACHADO, C. A. **Calogênese, quantificação de rutina, atividade antioxidante de acessos de mangabeira e viabilidade polínica de coqueiro anão verde de Fiji**. 2018. 133 f. Tese (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2018.

MARQUES, G. M. **Efeito do uso de citocininas no potencial embriogênico e obtenção de protoplastos em calos de Jequitibá-Rosa *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze**. 2021. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais -MG, 2021.

MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, C., KU-GONZÁLEZ, Á.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 225, n. 2, p. 695-708, 2018.

MONACO, L. C.; SONDHAL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. Applications of tissue culture in the improvement of Coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, cap. 6, p.109-248, 1977.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M. Estabelecimento *in vitro* de *Eremanthus incanus*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, 2019.

- MWANIKI, W. I.; LUBABALI, A. H.; ASAVA, K. K.; AGWANDA, C. O.; ANAMI, S. E. Effects of genotype and plant growth regulators on callus induction in leaf cultures of *Coffea arabica* L. F1 hybrid. **African Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 31, p. 1004-1015, 2019.
- NASCIMENTO, A. M. M. **Protocolo de indução da calogênese *in vitro* a partir de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba**. 2018. 37 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2018.
- NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação *in vitro* e estabilidade genômica em cana de açúcar**. 2013. 184f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.
- OLIVEIRA, A. C. A.; MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, L. A. R.; PADILHA, F. P.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, ANA da S. Induction and growth curve of calli from leaf and nodal explants of genipap. **Bioscience Journal**, v. 34, p. 161-167, 2018.
- OLIVEIRA, K. C. **Caracterização genotípica de plantas matrizes de cafeeiros e de suas progênies clonais obtidas por embriogênese somática**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas-SP, 2012.
- PADUA, M. S.; PAIVA, L. V.; SILVA, L. C.; LIVRAMENTO, K. G do; ALVES, E.; CASTRO, A. H. F.; Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural**, n. 44, p. 660-665, 2014.
- PAIVA, R. **Cultura de tecidos**- Curso de Pós- Graduação “Lato Sensu” Especialização a Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas. Universidade Federal de Lavras- MG, p. 97, 2001.
- PEREIRA, A. M. S.; LOURENÇO, M. V.; MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W.; MING, L. C.; GUERREIRO, C. P. V.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. *Jacaranda decurrens* Cham. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos Genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, v. 1, p. 257-294, 2007.
- RABELO, B. O. **Desenvolvimento de massa calogênica em clones de *Theobroma cacao* L.; e citogenética de calos radiculares**. 2019. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista-BA, 2019.
- REDDY, M.; SARITHA, K. V. Callus induction and somatic embryogenesis of *Gardenia latifolia* Ait. **International Journal Current of Science**, v. 4, p. 83-89, 2012.
- REZENDE, J. C.; CARVALHO, C. H. S. de; PASQUAL, M.; SANTOS, A. C. R.; CARVALHO, S. M. de. Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, p. 384-389, 2011.
- RIBEIRO, L. O. **Caracterização de suspensões celulares e obtenção de sementes sintéticas de *Coffea arabica* cv. Catiguá**. 2014. 97p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2014.
- RODRIGUES, F. A.; CAVALCANTI, V. P.; DÓRIA, J.; PASQUAL, M. Curva de crescimento de calos *Enterolobium contortisiliquum* induzidos *in vitro*. **Research, Society and Development**, v. 11, n.1, p.1-5, 2022.

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

SANTOS, D. N.; NUNES, C. F.; SOARES, J. D. R.; ALVES, E.; LABORY, C. R. C.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S. Ultrastructural and cytochemical analysis of physic nut callus tissue in response to different combinations of growth regulators, **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 3, p. 355-359, 2015.

SANTOS, M. R. A.; SILVA, A. C. S. Propagação vegetativa *in vitro* de híbridos de *Coffea canefora* por meio da embriogênese somática. **South American Journal**, v. 7, n. 1, p. 155-162, 2020.

SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S.; SILVA JUNIOR, J. F. **Descritores para o jenipapeiro**. Brasília, DF: Embrapa; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2020. p. 57.

SILVA, A. V. C.; FREIRE, K. C. S.; LÉDO, A. S.; RABBANI, A. R. C. Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa americana* L.) Brazilian. **Scientia Agricola**, v. 71, n.5, p. 345-355, 2014.

SILVA, D.; IMAKAWA, A. M.; BRUNO, F. M. S.; SAMPAIO, P. T. B. Indução de calos friáveis em explantes e segmentos nodais de pau ferro (*Caesalpinia ferrea*). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 4, p. 1044-1050, 2018.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de Murici-pequeno**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2009.

SILVA, T. S.; FILHO, R. S. L. C.; TANAN, T. T.; ROCHA, T. C.; SANTANA, J. R. F. de. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020.

SINGH, R.; RAI, M. K.; KUMARI, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-Benzylaminopurine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 498-510, 2015.

ŚLESIAK, H.; DZIEDZIC, K.; KWOLEK, D.; CYGAN, M.; MIZIA, P.; OLEJNICZAK, P.; JOACHIMIAK, A.J. Female versus male: *Rumex thyrsiflorus* Fingerh. under *in vitro* conditions. Does sex influence *in vitro* morphogenesis? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 521-532, 2017.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p.118-131, 1957.

SOUZA, A. C.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; CARVALHO, M. F.; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C.; NERY, F. C.; SALES, T. S.; ROSA, S. V. F. Indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. cv. Catuí amarelo. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, **Anais...**2015.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbono source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, v. 21, p. 212-218, 2011.

TEXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P da C.; MELLO, R. I. S de; SILVA, A. P. D da; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. 39 p. (Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12.ed., Porto Alegre: Artemed, 2017. p. 964.

VALENCIA-LOZANO, E.; IBARRA, J. E.; HERRERA-UBALDO, H.; DE FOLTER, S.; CABRERA-PONCE, J. L. Osmotic stress-induced somatic embryo maturation of coffee *Coffea arabica* L., shoot and root apical meristems development and robustness. **Science Reports**, v. 11, n. 1, p. 9661, 2021.

VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 7-17, 1996.

VÁSQUEZ, A. L. L. **Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares de *Duroi macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos secundários**. 2019. 158f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM, 2019.

WU, Y.; DOR, E.; HERSHENHORN, J. Strigolactones affect tomato hormone profile and somatic embryogenesis. **Planta**, v. 245, p. 583–594, 2017.

YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. In: **16th International Scientific Colloquium on Coffee**, v. 2, p. 537-541, 1995.

YEE, T. F.; GOH, C. J.; RAO, A. N. *In vitro* studies on *Genipa americana*. **Journal of Tropical Medicinal Plants**, v. 11, n. 1, p. 77–88, 2010.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p.1-9, 2011.