



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

**MORFOGÊNESE E CALOGÊNESE *in vitro* EM JENIPAPEIRO
(*Genipa americana* L.)**

ANNIE CAROLINA ARAÚJO DE OLIVEIRA

2016



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

ANNIE CAROLINA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**MORFOGÊNESE E CALOGÊNESE *in vitro* EM JENIPAPEIRO (*Genipa americana*
L.)**

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 Lédo
Co-orientadora
Prof.^a Dr.^a Francine Ferreira Padilha

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

O48m Oliveira, Annie Carolina Araújo de
Morfogênese e calogênese *in vitro* em jenipapeiro (*Genipa americana* L.) / Annie Carolina Araújo de Oliveira ; orientador Ana da Silva Ledo. – São Cristóvão, 2016.
42 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Agricultura. 2. Morfogênese. 3. Germoplasma vegetal - Recursos. 4. Propagação *in vitro*. I. Ledo, Ana da Silva, orient. II. Título.

CDU 631:582.936.1

ANNIE CAROLINA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**MORFOGÊNESE E CALOGÊNESE *in vitro* EM JENIPAPEIRO (*Genipa americana*
L.)**

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 26 de fevereiro de 20 16.

Prof.^a Dr.^a Ana Veruska Cruz da Silva Muniz
Embrapa Tabuleiros Costeiros/ UFS

Prof. Dr. Ricardo Elesbão Alves
Embrapa Agroindústria Tropical/ UFERSA/
UFPB

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

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

“Aperfeiçoamento pede esforço”.

Chico Xavier pelo espírito Emmanuel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu anjo da guarda por me guiar na conclusão de mais uma etapa.

À Dr.^a Ana da Silva Léo, pela orientação. Apesar da distância, sua dedicação e incentivo se fizeram presentes.

À Dr.^a Francine Ferreira Padilha pela colaboração.

À Dr.^a Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, pelo suporte e carinho.

À Dr.^a Aparecida Gomes de Araújo pelos ensinamentos transmitidos.

À Caroline de Araújo Machado pela parceria e acima de tudo entusiasmo!

À Leila Albuquerque e Milena Nascimento pela amizade!

À Inácio Roque, pelo apoio e ajuda diária.

À Kícia Gomes-Copeland, pelas recomendações.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), Isabella Miranda, Sara Dayan, Felipe Martins, Flávia Ludovice, Josi Félix, Paulo Neves por tornarem tudo mais divertido!

A Bruno Lima, do Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidades (LeFT) da Universidade Federal de Sergipe e a Isabelle de Mélo e Andriele Barbosa, do Laboratório de Biomaterias (LbMat), da Universidade Tiradentes, pela disponibilidade.

À Bruno Freitas, Thiago Xavier e Juliana Lopes, amigos pelos quais guardo um carinho especial.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros e ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), da Universidade Tiradentes (UNIT), pelo aporte de recursos.

À Universidade Federal de Sergipe, ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) e ao corpo docente pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais Rita Araújo e Jackson Oliveira por cuidarem de mim e apoiarem as minhas escolhas.

À vovó Ivone pelo amor incondicional.

A todos os familiares e amigos pela torcida.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
3. CONCLUSÕES GERAIS	7
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
5. ARTIGO 1: RESPOSTAS MORFOGÊNICAS NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E EIXOS EMBRIONÁRIOS DE JENIPEIRO	15
Resumo	15
Abstract.....	16
5.1. Introdução	17
5.2. Material e Métodos	18
5.3. Resultados e Discussão.....	19
5.4. Conclusões	23
5.5. Referências Bibliográficas	24
6. ARTIGO 2: INDUÇÃO E CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS OBTIDOS DE EXPLANTES FOLIARES E NODAIS DE JENIPEIRO	27
Resumo	27
Abstract.....	28
6.1. Introdução	29
6.2. Material e Métodos	29
6.3. Resultados e Discussão	30
6.4. Conclusões	38
6.5. Referências Bibliográficas	38
ANEXOS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
5.1	Extração, assepsia de sementes e excisão dos embriões zigóticos de jenipapeiro: A – Frutos maduros; B – Sementes após o beneficiamento; C – Assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar; D – Detalhe do embrião zigótico no endosperma (end); E – Embrião inteiro (ez) com cotilédone e eixo embrionário; F – Cotilédone (co) e eixo embrionário (ee) separados	19
5.2	Porcentagem de regeneração de explantes de embriões zigóticos inteiros (●) e eixos embrionários (◆) de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP, aos 30 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	20
5.3	A – Embrião zigótico com formação de parte aérea, aos 30 dias de cultivo; B – Plântula oriunda do cultivo de embrião zigótico inteiro, aos 90 dias de cultivo; C – Plântula oriunda do cultivo de eixo embrionário, aos 90 dias de cultivo	20
5.4	Comprimento da parte aérea em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	21
5.5	Número de folhas em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	22
5.6	A – Parte aérea atrofiada em plântula oriunda de embrião inteiro; B – Parte aérea atrofiada em plântula oriunda de eixo embrionário; C – Superfície do explante eixo embrionário com calo compacto (Tratamento com 0,4 mg L ⁻¹ de ANA com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP); D – Superfície do explante eixo embrionário com calo compacto (Tratamento com 0,6 mg L ⁻¹ de ANA com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP)	22
5.7	Ausência/presença de raízes em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	23
6.1	Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de <i>Genipa americana</i> L., aos 30 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	32
6.2	Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de <i>Genipa americana</i> L., aos 60 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	32
6.3	Aspecto geral de calos formados a partir de segmento foliar: A – Acesso NB; B – Acesso SA e C – Acesso SAL, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	33

6.4	Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos nodais de <i>Genipa americana</i> L. (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	34
6.5	Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos formados a partir de segmentos nodais de <i>Genipa americana</i> L., aos 30 e 60 dias de cultivo. (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo)	35
6.6	Aspecto geral de calos formados a partir de segmento nodal: A – Acesso NB; B – Acesso SA e C – Acesso SAL, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	35
6.7	Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos foliares de <i>Genipa americana</i> L. dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), inoculados em meio MS suplementado com 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 1,77 mg L ⁻¹ de BAP aos 60 dias de cultivo. I – Fase <i>lag</i> , II – Fase exponencial e III – Fase linear	36
6.8	Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de <i>Genipa americana</i> L. do acesso NB (◆), inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D e do acesso SAL (▲), inoculado em meio MS suplementado com 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase <i>lag</i> , II – Fase exponencial, III – Fase linear	37
6.9	Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de <i>Genipa americana</i> L. do acesso SA (■) inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase <i>lag</i> , II – Fase exponencial, III – Fase linear, IV – Fase de desaceleração e V – Fase estacionária	38

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
6.1	Massa fresca de calos (g) oriundos de segmento foliar dos acessos Núcleo Bandeirante (NB), Sabinópolis (SA) e Salvaterra (SAL) em função da concentração de 2,4-D aos 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	31
6.2	Massa fresca de calos oriundos de segmento nodal dos acessos Núcleo Bandeirante (NB), Sabinópolis (SA) e Salvaterra (SAL) aos 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2,4-D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
MS	Meio Murashige & Skoog (1962)
NB	Acesso de jenipapeiro Núcleo Bandeirante
SA	Acesso de jenipapeiro Sabinópolis
SAL	Acesso de jenipapeiro Salvaterra

RESUMO

OLIVEIRA, Annie Carolina Araújo de. **Morfogênese e calogênese *in vitro* em jenipapeiro (*Genipa americana* L.)**. São Cristóvão: UFS, 2016. 42 p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

A cultura de tecidos vegetais tem-se mostrado eficaz na multiplicação e conservação de recursos genéticos vegetais. O jenipapeiro (*Genipa americana* L.), da família Rubiaceae destaca-se pela sua pluralidade de usos, seja como essência florestal, na produção de frutos ou na medicina tradicional. Esse trabalho foi dividido em duas partes. A primeira objetivou estudar os efeitos das concentrações de ANA (0,0; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L⁻¹) em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP na morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos inteiros e eixos embrionários de jenipapeiro do acesso Núcleo Bandeirante (NB). Aos 30 dias, observou-se que a regeneração *in vitro* foi possível a partir da conversão de embriões inteiros em meio MS suplementado com 0,6 mg L⁻¹ de ANA. O maior comprimento da parte aérea, número de folhas e de raízes foram obtidas em meio isento de ANA. O aumento progressivo na concentração de ANA levou a formação de calos compactos, principalmente no segmento eixo embrionário. A regeneração via organogênese direta não foi observada. A segunda parte buscou determinar o efeito do 2,4-D (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹) na calogênese de explantes foliares e nodais de jenipapeiro e caracterizar a sua dinâmica de crescimento cinético. A melhor resposta de indução ocorreu na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,77 mg L⁻¹ de BAP para os explantes foliares dos acessos Núcleo Bandeirante (NB), Sabinópolis (SA) e Salvaterra (SAL), com destaque para o segundo, que apresentou uma biomassa de 0,2223 g, aos 60 dias de cultivo. No entanto, para calos obtidos a partir de segmentos nodais, a resposta de indução em função do 2,4-D foi diferenciada entre os acessos testados, sendo superior para os acessos NB e SA na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e para o acesso SAL, na de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. A cinética de crescimento foi estabelecida a partir da massa fresca dos calos em intervalos de 10 dias. A curva de crescimento de calos de explantes foliar e nodal apresentou um padrão linear, sendo detectada apenas três fases de crescimento: *lag*, exponencial e linear. Calos do acesso SA obtidos de segmento nodal devem ser transferidos para um novo meio de cultura ao 40º dia de cultivo.

Palavras-chave: Recurso genético vegetal, propagação *in vitro*, calo, regulador de crescimento vegetal.

* Comitê Orientador: Dr.^a Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora), Dr.^a Francine Ferreira Padilha – UNIT (Co-orientadora).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Annie Carolina Araújo de. **Morphogenesis and *in vitro* callus induction of genipap (*Genipa americana* L.)**. São Cristóvão: UFS, 2016. 42 p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity). *

Plant tissue culture has shown to be effective in multiplication and conservation of plant genetic resources. The genipap (*Genipa americana* L.), from the Rubiaceae family stands out for its plurality of uses, either as a forest species, fruit production or in traditional medicine. This study was divided into two parts. The first study investigated the effects of NAA concentrations (0.0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg L⁻¹) in combination with 1.0 mg L⁻¹ of BAP in the morphogenesis of genipap zygotic embryos and embryonic axis of Núcleo Bandeirante (NB) access. At 30 days, it was observed that the *in vitro* regeneration of genipap is possible from the conversion of whole embryos in a medium supplemented with 0.6 mg L⁻¹ NAA. The largest shoot length, number of leaves and roots were obtained in the medium NAA free. The progressive increase in the concentration of NAA induced the formation of compact calli, especially in the embryonic axis segment. Regeneration via direct organogenesis was not observed. The second part aimed to determine the effect of 2,4-D (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg L⁻¹) for induction of callus from leaf and nodal explants of genipap and characterize the dynamics of kinetics growth. The best induction response occurred at a concentration of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.77 mg L⁻¹ BAP for leaf explants of NB, SA and SAL accesses, with emphasis on access SA who presented a biomass of 0.2223 g after 60 days of cultivation. However, for callus obtained from nodal segments, the response due to 2,4-D was different between the accesses. The fresh weight increase was higher for NB and SA at concentration 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D and SAL, at 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D. The kinetics growth was established from the fresh weight of callus at intervals of 10 days. The growth curve of leaf and nodal explants callus showed a linear pattern and only three stages of growth were observed: lag, exponential and linear. Calli of SA nodal segment should be transferred to a new culture medium after 40 days of cultivation.

Keywords: Plant genetic resource, *in vitro* propagation, callus, plant growth regulator.

* Supervising Committee: Dr.^a Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora), Dr.^a Francine Ferreira Padilha – UNIT (Co-orientadora).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O impacto sobre o meio ambiente causado por atividades antrópicas é medido de várias maneiras, no entanto, a perda da biodiversidade é tida como o fator de maior relevância. Para os vegetais, a manutenção da diversidade genética é importante, pois esses recursos constituem-se num reservatório natural de genes, com potencial de uso em programas de melhoramento, de onde podem ser obtidos cultivares mais resistentes, capazes de se adaptarem às mais diferentes condições ambientais.

Com os avanços na área da Biotecnologia, novas técnicas foram sendo desenvolvidas para maximizar a qualidade e o rendimento dos cultivos agrícolas. Entre elas, destaca-se a cultura de tecidos, que tem sido incrementada como parte integrante em diferentes setores da agricultura. Sua aplicação tornou possível a conservação dos recursos genéticos vegetais em bancos de germoplasma *in vitro*, a produção de mudas em larga escala, a transformação genética de plantas, a produção de metabólitos secundários de interesse comercial, entre outros.

Do ponto de vista da propagação *in vitro*, a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais de multiplicação, especialmente para espécies que não produzem sementes ou cujas sementes são recalcitrantes e àquelas que são propagadas vegetativamente. As vantagens da aplicação dessa ferramenta incluem, entre outras, a multiplicação clonal de indivíduos superiores em condições controladas e ambiente asséptico e a redução da demanda por espaço e mão de obra. Diversos explantes podem ser utilizados no estabelecimento *in vitro* de culturas, e tecidos mais jovens, tais quais embriões zigóticos, que possuem maior competência celular, têm sido largamente empregados na observação de processos que controlam a morfogênese *in vitro*.

Outra contribuição da cultura de tecidos, está relacionada a produção de compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal. As plantas são uma fonte natural de substâncias biologicamente ativas, com propriedades diferenciadas que despertam o interesse comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar e agrônômica. A cultura de calos tem sido amplamente difundida na produção desses compostos e o acompanhamento do seu desenvolvimento ao longo do período de cultivo fornece dados importantes que podem subsidiar a seleção de fatores para otimização do rendimento *in vitro*.

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.), da família Rubiaceae, encontra-se distribuído por toda a região neotropical. No Brasil, ocorre em diversas formações florestais, incluindo áreas de várzeas. Trata-se de uma espécie de relevância socioeconômica, podendo ser utilizada como essência florestal ou fornecedora de frutos, os quais podem ser consumidos *in natura* ou utilizados como matéria-prima na fabricação de alimentos e bebidas. Além de ser empregado na medicina popular, no tratamento de enfermidades.

O objetivo do trabalho foi gerar conhecimentos técnico-científicos relacionados à morfogênese no cultivo de embriões zigóticos para obtenção de plantas e à dinâmica de crescimento celular de calos de jenipapeiro, por meio da aplicação de técnicas de cultura de tecidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Biotecnologia aplicada à cultura de tecidos vegetais

Os recursos genéticos vegetais são essenciais para garantir a segurança alimentar e nutricional (FAO, 2014), uma vez que esses, além de serem a base da cadeia alimentar do homem, atendem a outras necessidades relacionadas à geração de energia, vestuário, medicamentos e habitação (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2011). A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) define os recursos genéticos como “material genético de valor real ou potencial” (BRASIL, 2000). No caso dos vegetais, esses recursos genéticos compreendem a diversidade genética contida nas formas primitivas de espécies cultivadas e variedades tradicionais, cultivares modernas, cultivares obsoletas, linhagens e estoques genéticos e espécies selvagens (RAO, 2004).

A existência da variabilidade genética permitiu por meio do melhoramento genético, a obtenção de cultivares mais produtivos, resistentes a pragas e doenças e adaptados aos mais diferentes ambientes (BRAMMER, 2002). No entanto, o que se observa é a redução dessa variabilidade genética provocada por fatores como, a substituição de espécies e variedades locais por cultivares uniformes, o uso indiscriminado do material vegetal e mudanças nos habitats naturais pela ação antrópica (PITMAN e JORGENSEN, 2002). Assim, o estabelecimento de uma agricultura moderna, baseada na conservação e uso racional dos recursos genéticos vegetais, se torna fundamental nos dias atuais.

Com o advento da Biotecnologia, novas práticas fundamentadas no desenvolvimento de processos e produtos que subsidiem o emprego de estratégias voltadas para a multiplicação, conservação e manejo sustentável são indispensáveis para reduzir os riscos de erosão genética em espécies de importância ecológica e econômica, já que essas constituem-se num reservatório natural de genes (PAUNESCU, 2009). Um desses grandes avanços biotecnológicos foi o desenvolvimento da técnica de cultura de tecidos (REED et al., 2011).

A cultura de tecidos vegetais envolve um conjunto de técnicas nas quais um explante é isolado e cultivado sob condições assépticas, em um meio de nutritivo artificial. É baseada no princípio da totipotencialidade, ou seja, na capacidade que uma célula tem de gerar um organismo completo, uma vez que ela contém a informação genética necessária para tal (GEORGE, 2008). Dentre as aplicações dessa tecnologia, destacam-se o melhoramento genético, o manejo, intercâmbio e conservação de germoplasma, entre outras aplicações, como a micropropagação e a produção *in vitro* de compostos secundários, que foram abordados no presente estudo.

2.1.1. Propagação *in vitro* via cultura de embriões zigóticos

A propagação *in vitro* surge como uma alternativa para espécies que normalmente, não produzem sementes ou cujas sementes são recalcitrantes e não toleram armazenamentos prolongados e àquelas que são propagadas vegetativamente. A sua utilização viabiliza, principalmente, a maximização da produção de mudas com fidelidade genética ao material de origem e com qualidade fitossanitária, dada as condições de cultivo altamente assépticas (ENGELMANN, 2011). Além disso, vem sendo utilizada na propagação em larga escala de espécies de interesse comercial, de frutíferas como o abacaxi (SOUZA et al., 2012); entre ornamentais, com destaque para orquídeas (RODRIGUES et al., 2015); e espécies florestais, como o eucalipto (SILVA et al., 2015).

Essa técnica constitui um importante avanço não só na obtenção de mudas, mas na manipulação de processos de regeneração, que ocorrem por organogênese ou por embriogênese somática. A organogênese conceitua-se como a formação de estruturas a partir de órgãos vegetais, podendo ocorrer diretamente, por meio da regeneração de plantas sem passar pela fase de calo ou, indiretamente, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo. A embriogênese somática, por vez, é uma via de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, e pode ocorrer da mesma forma, com ou sem a formação de calos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No entanto, a propagação *in vitro* só é viável quando levado em consideração as informações acerca do potencial regenerativo que cada genótipo apresenta, diante das respostas morfogênicas que diferentes explantes, composição do meio e condições de cultivo podem ocasionar (CEZAR et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2014).

Como regra geral, tecidos mais jovens possuem maior competência celular. Por isso, o cultivo de embriões zigóticos tem sido empregado na observação de processos que controlam a morfogênese *in vitro* e culminam na obtenção de órgãos ou embriões somáticos (ELHITI & STASOLLA, 2011). Ao longo dos últimos anos, inúmeras espécies foram regeneradas a partir de embriões zigóticos, a saber *Azadirachta indica* A. Juss (LÉDO et al., 2008), *Bactris gasipaes* Kunth (STEINMACHER et al., 2007) e *Harconia speciosa* Gomes (FREIRE et al., 2011).

Os reguladores de crescimento vegetal são adicionados ao meio de cultura para suprir possíveis deficiências endógenas nos explantes e induzir os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular. As auxinas e as citocininas destacam-se como os principais reguladores de crescimento, sendo a concentração um dos fatores que mais influenciam o processo de desenvolvimento *in vitro* (LÉDO et al., 2008).

As auxinas regulam aspectos do desenvolvimento dos vegetais, incluindo o alongamento caulinar, a dominância apical e os movimentos trópicos. São frequentemente usadas na indução do desenvolvimento de gemas laterais e de raízes adventícias. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As citocininas estimulam a divisão celular, e são indispensáveis durante a fase de multiplicação. Em concentrações elevadas, induzem o crescimento de parte aérea e inibem a formação de raízes. As citocininas mais usadas são: a cinetina (KIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (Zea) e thidiazuron (TDZ) (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Como apresentado anteriormente, auxinas e citocininas regulam a morfogênese *in vitro* e a utilização desses reguladores influenciam diretamente na competência dos tecidos vegetais. Altas concentrações de ANA no meio de cultura favoreceram o enraizamento de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza, comumente conhecida por catuaba (SOUZA et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos por Rocha et al. (2008), que verificaram que na concentração de 9,8µM de AIB, a porcentagem de enraizamento *in vitro* do acesso de jenipapeiro JRB59 foi de 70% e do acesso JRB69, de 43,3%. Já a alta razão citocinina e auxina promoveu a formação de parte aérea em *Calendula officinalis* L. (VICTÓRIO et al., 2012), *Malva sylvestris* L. (FILTER et al., 2014) e *G. americana* L. (YEE et al., 2010).

A combinação de reguladores de crescimento vegetal também pode favorecer o crescimento de calos na superfície dos explantes. E, apesar de não ser uma rota preferencial, o cultivo de calos tem subsidiado estudos relacionados à embriogênese somática e a produção *in vitro* de metabólitos secundários (GONÇALVES & ROMANO, 2013).

2.1.2. Produção *in vitro* de metabólitos secundários com ênfase na cultura de calos

As plantas são uma fonte natural de compostos biologicamente ativos aos quais são derivados do seu metabolismo primário ou secundário. Entende-se por metabolismo primário, o conjunto de processos que desempenham funções vitais no vegetal, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Carboidratos, lipídios, proteínas e nucleotídeos são alguns das macromoléculas inerentes a esse metabolismo, que possuem distribuição universal nos vegetais (PERES, 2004).

Além do metabolismo primário, as plantas produzem em quantidades menores metabólitos secundários, que consistem de micromoléculas, de estrutura complexa e diversificada, cujas funções adaptativas, auxiliam na perpetuação e sobrevivência dos organismos, seja na atração de polinizadores, na proteção contra a ação de insetos, patógenos e animais herbívoros ou mesmo mudanças no ambiente (CHAMPE et al., 2008). Esses são classificados de acordo com a sua origem biossintética, em três grupos principais: alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (FUMAGALI et al., 2008).

Os compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal têm despertado a atenção por apresentarem uma gama de atividades biológicas, com utilização não só na indústria farmacêutica, para formulação de fitoterápicos, como nas indústrias de cosméticos, como aromatizantes ou antioxidantes e de alimentos, como flavorizantes e corantes ou ainda na área agropecuária, como biopesticidas (BARBOSA-FILHO et al., 2007; BIAVATTI et al., 2007; SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2012).

O extrativismo é a principal forma de obtenção do material vegetal, para extração dos metabólitos secundários, o que torna o processo indiscriminado, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Concomitantemente, as plantas, quando em ambiente natural, estão sujeitas a variações sazonais, ataque de pragas e doenças e fatores abióticos, o que pode afetar diretamente a produção desses compostos (GRAY, 2003; SANTOS et al., 2007).

Dessa forma, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos apresenta-se como um recurso alternativo para o desenvolvimento de processos que permitam a produção dessas substâncias, sem influência de fatores externos. A principal vantagem desta tecnologia é que ela pode fornecer uma produção contínua de compostos bioativos, além de poder ser usada para o cultivo em larga escala (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Atualmente, um esforço considerável tem sido feito no intuito de obter substâncias ativas que tenham sido acumuladas em culturas de células vegetais. E, estudos demonstram que o cultivo *in vitro* de calos vem sendo bastante explorado para o estabelecimento inicial de linhagens celulares mais promissoras e de alto rendimento (FUMAGALI et al., 2008).

Calos são caracterizados como uma massa não organizada de células, proveniente da resposta de tecidos vegetais dos quais são iniciados, a estímulos entre a combinação de reguladores de crescimento e condições de cultivo (GEORGE, 2008). Esses podem ser obtidos a partir de diversos órgãos, incluindo explantes foliares, de espécies como: *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (VASCONCELOS et al., 2012), *Jatropha curcas* L. (FEITOSA et al., 2013) e *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvi (SANTOS et al., 2014); e explantes nodais, como *Passiflora alata* Curtis (PACHECO et al., 2012), entre outros.

O uso de reguladores de crescimento vegetal tende a ser crucial na calogênese (NOGUEIRA et al., 2007). Em estudo com *Ceropegia bulbosa* Roxb., uma planta medicinal da Índia, o índice de indução de calos foi de 75% em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg L⁻¹ de BAP e nulo na ausência desses reguladores

(PHULWARIA et al., 2013). Em contrapartida, Nogueira et al. (2007) observaram a formação de calos em explantes foliares de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (murici pequeno), em meio MS com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, o que pode ser explicado pelo conteúdo endógeno de citocinina no explante ser suficiente para o estabelecimento de uma rota indireta.

Diferenças no potencial morfogênico de explantes foliares e nodais de jenipapeiro foram demonstrados por Almeida et al. (2015). Em segmentos foliares houve maior formação de calos na presença de 8,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, enquanto que explantes nodais responderam melhor na presença de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Quando cultivados na ausência desses reguladores vegetais, segmentos nodais apresentaram maior tendência a organogênese direta.

O acompanhamento do desenvolvimento de calos em meio de indução auxilia na determinação das melhores condições de cultivo, além de indicar o momento ideal de transferência para um novo meio (VASCONCELOS et al., 2012). George (2008) relata que o padrão de crescimento dos calos ocorre em três estágios, de indução, divisão e diferenciação celular, os quais são verificados através da curva de crescimento em seis fases distintas: *lag*, exponencial, linear, desaceleração, estacionário e declínio. Estudos cinéticos através do estabelecimento da curva de crescimento de calos foram realizados em espécies como café (SANTOS et al., 2008), aroeira do sertão (VASCONCELOS et al., 2012) e pinhão manso (FEITOSA et al., 2013).

2.2. O jenipapeiro: Aspectos botânicos, importância e usos

Rubiaceae é uma das maiores famílias botânicas entre as angiospermas (DELPRETE & JARDIM, 2012), com mais de 13.000 espécies, distribuídas em 611 gêneros (DAVIS et al., 2009), e três subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae, de acordo com classificação atual proposta por Bremer e Eriksson (2009). O gênero *Genipa* L., pertence à subfamília Ixoroideae, e a tribo Gardenieae (KAINULAINEN et al., 2013), sendo reconhecida como um táxon com apenas duas espécies: *G. americana* L. e *G. infundibuliformis* Zappi & Semir (DELPRETE et al., 2005).

Genipa americana L., comumente conhecida por jenipapeiro, está amplamente distribuída por toda a região neotropical, desde o México até a Argentina (UNCTAD, 2005). No Brasil, sua ocorrência tem sido reportada nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea da região Nordeste (PRUDENTE, 2002) e no Centro-Oeste, em áreas de Mata Seca, Cerradão e Mata de Galeria (SILVA et al., 2001), entre outras formações florestais. Em Sergipe, essa espécie é comumente cultivada em pomares dentro de pequenas propriedades agrícolas, podendo ser encontrada em fragmentos naturais de vegetação remanescente e em regiões de matas ciliares (SILVA et al., 2009), por tolerar solos encharcados (OLIVEIRA et al., 2014).

Trata-se de uma espécie arbórea semidecídua, com 8 a 14 m de altura e diâmetro a altura do peito (DAP) variando entre 40 a 60 cm, com tronco retilíneo e cilíndrico, copa estreita e folhas simples opostas (LORENZI, 2008). A rusticidade dessa espécie torna-a adaptável a várias condições climáticas e edáficas, porém tem preferência por áreas com solos ligeiramente ácidos, de precipitação anual entre 1200 e 4000 mm e temperaturas médias entre 18 e 28°C (PRUDENTE, 2002; UNCTAD, 2005).

O jenipapo, fruto do jenipapeiro, é do tipo baga globosa (LORENZI, 2008), com várias sementes, que são classificadas como intermediárias, por apresentarem certa tolerância à dessecação, apesar de não suportarem longos períodos de armazenamento (CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; MAGISTRALI et al., 2013). A propagação

ocorre via sexuada ou assexuada (PRADO NETO et al., 2007). Abelhas e beija-flores foram relatados como agentes polinizadores da espécie, em fragmento de Mata atlântica, no estado de Pernambuco, Brasil (KIMMEL et al., 2010).

É considerada como uma espécie de importância econômica, tanto pelo seu potencial florestal, sendo empregado em programas de recuperação de áreas protegidas por Lei (SANTOS et al., 2011; RABBANI et al., 2012), quanto pela produção de frutos, que são consumidos *in natura* ou utilizados como matéria-prima de alimentos e bebidas (FERNANDES & RODRIGUES, 2012) sendo também uma fonte natural de corante (ECHEVERRY et al., 2011).

Estudos recentes também demonstraram a capacidade do jenipapeiro como fitorremediador, sobretudo como planta fitoestabilizadora e rizofiltradora do cromo, um metal pesado, prejudicial aos organismos vivos (BARBOSA et al., 2007; SANTANA et al., 2012). Outros autores incluem a utilização dessa espécie na arborização urbana (SANTOS et al., 2015) e de pastagens, fornecendo sombra e abrigo aos animais (SALMAN et al., 2008) e como forrageira (PINTO-RUIZ et al., 2005).

Na medicina popular, frutos, folhas e raízes são empregados no tratamento de enfermidades. As folhas são antissifilíticas e, em infusão, eliminam substâncias tóxicas presentes no sangue. Os frutos, ricos em ferro, são indicados no combate à anemia, e a sua casca tem propriedades adstringentes. Os frutos também são indicados no combate a osteoporose, diabetes e colesterol. A raiz tem efeito purgativo (AGRA et al., 2008; ALVES et al., 2008; CORDEIRO & FÉLIX, 2014).

Do ponto de vista fitoquímico, *G. americana* é caracterizada pela presença de iridoides, compostos monoterpênicos que ocorrem nos vegetais, quase sempre na forma glicosilada, ou seja, ligados a um monossacarídeo (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001). Dentre os iridoides isolados de frutos maduros de jenipapeiro destaca-se a genipina (DJERASSI et al., 1960), cujas propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas foram demonstradas por Koo et al. (2004) e Ueda e Iwahashi (1991).

3. CONCLUSÕES GERAIS

Com os avanços na área da Biotecnologia vegetal torna-se possível a aplicação de técnicas de cultura de tecidos para os mais diversos fins. O conhecimento do potencial morfogênico de embriões zigóticos cultivados em diferentes concentrações de reguladores de crescimento vegetal pode possibilitar o estabelecimento de novas formas de propagação do jenipapeiro, para o seu cultivo e exploração sustentável.

Da mesma forma, que estudos sobre a dinâmica do crescimento celular *in vitro* permite o estabelecimento de estratégias voltadas para a produção de metabólitos secundários, com intuito de otimizar a produção de compostos de interesse.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.

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**, v.28, n.1, p.58-64, 2015.

ALVES, E.O.; MOTA, J.H.; SOARES, T.S.; VIEIRA, M.C.; SILVA, C.B. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados – MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.651-658, 2008.

BARBOSA, R.M.T.; ALMEIDA, A-A.F.; MIELKE, M.S.; LOGUERCIO, L.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; GOMES, F.P. A physiological analysis of *Genipa americana* L.: a potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, n.3, p. 264-271, 2007.

BARBOSA-FILHO, J.M.; JÚNIOR, F.A.N.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.141-148, 2007.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.640-653, 2007.

BRAMMER, S.P. **Variabilidade e diversidade genética vegetal**: requisito fundamental em um programa de melhoramento. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 9 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 29). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do29.htm> Acesso em: 20 nov. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **A convenção sobre diversidade biológica**: cópia do decreto legislativo n. 2, de 5 de junho de 1992. Brasília: MMA/SBF/DCBio, 2000. 32 p. (Série Biodiversidade 2)

BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating family, subfamilies and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v.170, n.6, p.766-793, 2009.

CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, n.1, p.53-56, 2000.

- CEZAR, T.M.; HIGA, A.R.; KOEHLER, H.S.; RIBAS, L.L.F. Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda* L. **Ciência Florestal**, v.25, n.1, p.13-22, 2015.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 533 p.
- 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.
- DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; RUHSAM, M.; MOAT, J.; BRUMMITT, N.A. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.96, n.1, p.68-78, 2009.
- DELPRETE, P.G.; JARDIM, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v.63, n.1, p.101-128, 2012.
- DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. Rubiáceas. REIS, A. (Ed.). In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2005. p.542-549.
- DJERASSI, C.; GRAY, J.D.; KINCL, F. Isolation and characterization of genipin. **Journal of Organic Chemistry**, v.25, p. 2174-2177, 1960.
- ECHEVERRY, L. F.; ZAPATA, S. P.; TORRES, L. F. **Blue colorant derived from *Genipa americana* fruit**. US 7927637 B2, 3 out. 2008, 19 abr. 2011.
- ELHITI, M.; STASOLLA, C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. In: THORPE, T. A.; YEUNG, E. C. (Eds.). **Plant embryo culture: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011. p.229-255.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.47, n.1, p.5-16, 2011.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. (Eds.). **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p.511-551.
- FEITOSA, L.S.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M.P.; BLANK, A. F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v.29, n.2, p.370-377, 2013.

FERNANDES, F.; RODRIGUES, S. Ultrasound as pre-treatment for drying of genipap (*Genipa americana* L.). **International Journal of Food Engineering**, v.8, n.3, p.1556-3758, 2012.

FILTER, M.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. Influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores ácido 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na propagação vegetativa de *Malva sylvestris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.47-53, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 2014. 182 p.

FREIRE, K.C.S.; COELHO, G.G.; RUSSO, S.L.; SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; SÁ, A.J.; MACHADO, C.A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Harcornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, v.7, n.11, p.1-7, 2011.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.627-641, 2008.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure: background. In: MERRIOTT, E.F.G.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. (Eds.) **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2008. p.1-28.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.31, n.2, p.166-174, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa- CNPH, 1998. p.183-260.

GRAY, E.D. **Establishment of a callus culture and measurement of seasonal changes in secondary compound production in *Eucommia ulmoides* Oliver**. 2003, 58 f. M.S. Thesis (School of Forestry, Wildlife, and Fisheries) - Louisiana State University, Baton Rouge – LA, 2003.

KAINULAINEN, K.; RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; BREMER, B. Phylogenetic relationships and new tribal delimitations in subfamily Ixoroideae (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.173, n.3, p.387-406, 2013.

KIMMEL, T.M.; NASCIMENTO, L.M.; PIECHOWSKI, D.; SAMPAIO, E.V.S.B.; RODAL, M.J.N.; GOTTSBERGE, G. Pollination and seed dispersal modes of woody species of 12-year-old secondary forest in the Atlantic Forest region of Pernambuco, NE Brazil. **Flora**, v.205, n.8, p.540-547, 2010.

KOO, H.J.; SONG, Y.S.; KIM, H.J.; LEE, Y.H.; HONG, S.M.; KIM, S.J.; KIM, B.C.; JIM, C.; LIM, C.J.; PARK, E.H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v.495, n.2, p.201-208, 2004.

LÉDO, A.S.; BLANK, A.F.; BARBOZA, S.B.S.C.; RANGEL, M.S.A.; LÉDO, C.A.S. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.1-5, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 368 p.

MAGISTRALI, P.R.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J.M.R.; GASPARIN, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v.35, n.4, p.495-500, 2013.

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.

OLIVEIRA, M.T.; DAMASCENO-JÚNIOR, G.A.; POTT, A.; PARANHOS FILHO, A.C.; SUAREZ, Y.R.; PAROLIN, P. Regeneration of riparian forests of the Brazilian Pantanal under flood and fire influence. **Forest Ecology and Management**, v.311, p.256-263, 2014.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v.144, p.42-47, 2012.

PAUNESCO, A. Biotechnology for endangered plant conservation: an critical averview. **Romanian Biotechnological Letters**, v.14, n.1, p.4095-4103, 2009.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: ESALQ, 2004. 26 p.

PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N.S.; RATHORE, J.S.; SINGH, R.P. An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb.: a threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.25-29, 2013.

PINTO-RUIZ, R.; GÓMEZ, H.; MARTÍNEZ, B.; HERNÁNDEZ, A.; MEDINA, F.J.; GUTIÉRREZ, R.; ESCOBAR, E.; VÁZQUEZ, J. Árboles y arbustos forrajeros del sur de Mexico. **Pastos y Forrajes**, v.28, n.2, p.87-97, 2005.

PITMAN, N.A.; JØRGENSEN, P.M. Estimating the size of the world's threatened flora. **Science**, v.298, n.5595, p.989, 2002.

PRADO NETO, M.; DANTAS, A.C.V.L.; VIEIRA, E.L.; ALMEIDA, V.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.

PRUDENTE, R.M. Jenipapo (*Genipa americana* L.). In: VIEIRA NETO, R.D. **Frutíferas potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas**. (Ed.). Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros/Emdagro, 2002. p. 88-112

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.

RAO, N.K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.136-145, 2004.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, n.2 p.101-153, 2002.

REED, B.M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.47, v.1, p.1-4, 2011.

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.

RODRIGUES, L.A.; PAIVA NETO, V.B.; BOARETTO, A.G.; OLIVEIRA, J.F.; TORREZAN, M.A.; LIMA, S.F.; OTONI, S.F. *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, n.1, p.10-17, 2015.

SALMAN, A.K.D.; LÓPEZ, G.F.Z.; BENTES-GAMA, M.M. ANDRADE, C.M.S. **Espécies arbóreas nativas da Amazônia Ocidental Brasileira com potencial para arborização de pastagens**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008. 20 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 127).

SAMPAIO-SANTOS, M.I.; KAPLAN, M.A. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p.144-153, 2001.

SANTANA, K.B.; ALMEIDA, A-A.F.; SOUZA, V.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C.; GOMES, F.P.; DUTRUCH, L.; LOGUERCIO, L.L. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds.

Environmental and Experimental Botany, v.80, p.35-42, 2012.

SANTOS, A.R.F.; SILVA-MANN, R.S.; FERREIRA, R.A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, v.35, n.2, p.213-220, 2011.

SANTOS, A.S.; ARAÚJO, S.F.; GOULART, H.F.; CAETANO, L.C.; ARRUDA, M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTA'ANA, A.E.G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.538-541, 2007.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, P.D.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v.20, n.1, p.22-29, 2008.

SANTOS, C.Z.A.; FERREIRA, R.A.; SANTOS, L.R.; SANTOS, L.I.; GOMES, S.H.; GRAÇA, D.A.S. Análise qualitativa da arborização urbana de 25 vias públicas da cidade de Aracaju – SE. **Ciência Florestal**, v.25, n.3, p.751-763, 2015.

SANTOS, M.R.A.; ROCHA, J.F.; PAZ, E.S.; SMOZINSKI, C.V; NOGUEIRA, W.O.; GUIMARÃES, M.C.M. Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.10, n.2, p.41-46, 2014.

SILVA, A.L.L.; GOLLO, A.L.; BRONDANI, G.E.; HORBACH, M.A.; OLIVEIRA, L.S.; MACHADO, M.P.; LIMA, K.K.D.; COSTA, J.L. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v.47, n.1, p.311-318, 2015.

SILVA, A.V.C.; YAGUIU, P.; ALMEIDA, C.S.; FEITOSA, R.B. **Caracterização físico-química de jenipapo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 4 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado técnico, 99).

SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

SOUZA, A.V.V.; OLIVEIRA, F.J.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.51-58, 2015.

SOUZA, E.H.; SOUZA, F.V.D.; SILVA, M.J.; SOUZA, A.S.; COSTA, M.A.P.C. Growth regulators and physical state of culture media in the micropropagation of ornamental pineapple hybrids. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.8, n.1-2, p.10-17, 2012.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v.35, n.9, p.1549-1553, 2012.

STEINMACHER, D.A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.43, n.2, p. 124-132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v.54, n.6, p.1677-1680, 1991.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT - UNCTAD. **Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: *Genipa americana*, jagua, huito**. Holanda: UNCTAD/BTFP, 2005. 38 p.

VASCONCELOS, J.M.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; MALDANER, J.; RÊGO, M.M.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. *In vitro* propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by carbon sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.50, n.6, p.746-751, 2014.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VICTÓRIO, C.P.; LAGE, C.L.S; SATO, A. Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.3, p.539-545, 2012.

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.71-88, 2010.

5. ARTIGO 1: RESPOSTAS MORFOGÊNICAS NO CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E EIXOS EMBRIONÁRIOS DE JENIPEIRO

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

RESUMO

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos tem sido empregado na observação de processos que controlam a morfogênese, devido à competência desses tecidos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do ANA em combinação com o BAP no potencial morfogênico de embriões zigóticos de jenipapeiro. Sementes obtidas de frutos maduros do acesso Núcleo Bandeirante (NB) tiveram seus embriões zigóticos excisados, os quais foram utilizados inteiros ou seccionados na região do eixo embrionário e inoculados em meio MS suplementado com 0,0; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L⁻¹ de ANA combinado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Após 30 dias avaliou-se o potencial de regeneração dos explantes e aos 90 dias verificou-se o comprimento da parte aérea, o número de folhas e a ausência ou presença de raízes nas plântulas formadas. Observou-se que é possível a regeneração *in vitro* de jenipapeiro a partir da conversão de embriões inteiros em meio MS suplementado com 0,6 mg L⁻¹ de ANA. O aumento progressivo na concentração de ANA induz a formação de calos compactos, principalmente no segmento eixo embrionário. Não houve regeneração via organogênese direta.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., cultura de tecidos, reguladores de crescimento vegetal, calo.

ABSTRACT***In vitro* MORPHOGENIC RESPONSE OF GENIPAP ZYGOTIC EMBRYOS AND EMBRYONIC AXIS**

The *in vitro* culture of zygotic embryos has been employed in the observation of processes that control the morphogenesis, due to the competence of these tissues. The aim of this study was to evaluate the effect of ANA in combination with BAP in the morphogenic potential of genipap zygotic embryos. Seeds obtained from ripe fruits of Núcleo Bandeirante (NB) access had their zygotic embryos excised, which were used whole or sectioned in the embryonic axis region and inoculated on MS medium supplemented with 0.0; 0.2; 0.4 and 0.6 mg L⁻¹ NAA with 1.0 mg L⁻¹ BAP. After 30 days the potential for regeneration of explants was evaluated and at 90 days the shoot length, number of leaves and the absence or presence of roots in seedlings formed was observed. The *in vitro* regeneration of genipap is possible from the conversion of whole embryos in a medium supplemented with 0.6 mg L⁻¹ NAA. The progressive increase in the concentration of NAA induced the formation of compact callus, especially in the embryonic axis segment. There was no regeneration via direct organogenesis.

Keywords: *Genipa americana* L., tissue culture, plant growth regulators, callus.

5.1. Introdução

Genipa americana L. (Rubiaceae), comumente conhecida por jenipapeiro, ocorre naturalmente em vários estados brasileiros (ZAPPI, 2015). É considerada uma espécie de importância econômica, tanto pelo seu potencial florestal, quanto ambiental, já que é indicada na recuperação de áreas degradadas (CORRÊA et al., 2015; DURÃES et al., 2014). Seus frutos, que podem ser consumidos *in natura*, servem de matéria-prima para alimentos e bebidas (FERNANDES & RODRIGUES, 2012), sendo também uma fonte natural de corante (ECHEVERRY et al., 2011). Do ponto de vista etnobotânico, frutos, folhas e raízes são utilizados no tratamento de enfermidades (SILVA et al., 2015; VASQUÉZ et al., 2014).

O jenipapeiro é explorado predominantemente de maneira extrativista e, como consequência, essa espécie sofre uma acelerada erosão genética (RABBANI et al., 2012). Normalmente, sua propagação ocorre por via sexuada, porém problemas como uniformidade de germinação e recalcitrância das sementes, implicam na busca por alternativas complementares, diferente dos métodos convencionais (MAGISTRALI et al., 2013; NASCIMENTO & DAMIÃO-FILHO, 1998).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos surge como uma ferramenta para superar problemas de propagação apresentados por espécies como o jenipapeiro. A sua utilização pode viabilizar não só a maximização da produção de mudas com fidelidade genética ao material de origem e com qualidade fitossanitária, como garantir a conservação do germoplasma dessa espécie fora do seu local de origem (REED et al., 2011).

No entanto, a propagação *in vitro* só é viável quando levado em consideração as informações do potencial regenerativo que cada genótipo apresenta, diante das respostas morfogênicas que diferentes tipos de explantes, composição do meio e condições de cultivo possam ocasionar (ELHITI & STASOLLA, 2011). Como regra geral, tecidos mais jovens possuem maior competência celular. Por isso, o cultivo de embriões zigóticos tem sido empregado para observação de processos que controlam a morfogênese *in vitro* (HU & FERREIRA, 1998).

Quanto mais informações acerca da morfogênese *in vitro*, a possibilidade de se desenvolver tecnologias, que futuramente possam auxiliar no estabelecimento de protocolos via organogênese direta ou embriogênese somática, facilitará nos estudos que interferem, não só na propagação em larga escala, mas na transformação genética de plantas e na produção de compostos secundários (BAQUE et al., 2012; LÉDO et al., 2007; PATEL et al., 2014). Além disso, o uso de embriões zigóticos e suas estruturas em protocolos de criopreservação tem sido relatado com sucesso para diversas espécies tropicais como *Coffea arabica* (DUSSERT et al., 2002), *Jatropha curcas* (PRADA et al., 2015) e *Cocos nucifera* (SAJINI et al., 2011), sendo promissor para o jenipapeiro.

Não existem informações disponíveis sobre o comportamento de embriões zigóticos de jenipapeiro sob condições de cultivo *in vitro*. No entanto, resultados promissores com a germinação de sementes dessa espécie foram obtidos por Almeida et al. (2013).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do potencial morfogênico de embriões zigóticos e eixos embrionários de jenipapeiro em diferentes condições de cultivo *in vitro*.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material vegetal

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Aracaju, Sergipe.

Frutos maduros (FIGURA 5.1 A) provenientes de populações naturais da região Núcleo Bandeirante, Distrito Federal (15°51'55.72''S; 47°57'34.59''O), foram lavados e despolidos. As sementes extraídas foram mantidas por 24 horas em temperatura ambiente (FIGURA 5.1 B) e posteriormente, submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar, seguindo metodologia proposta por (ROCHA et al., 2008).

A assepsia constou da imersão em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) com 2,5% (v/v) de cloro ativo com duas gotas de Tween-20[®] sob agitação por 20 minutos (FIGURA 5.1 C). Em seguida, as sementes foram lavadas, três vezes, em água destilada e autoclavada e transferidas para placas de Petri.

5.2.2. Efeito do ANA na morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos inteiros e eixos embrionários de jenipapeiro

Após a assepsia, as sementes tiveram seus tegumentos removidos e os embriões zigóticos (FIGURA 5.1 D) foram excisados, em câmara de fluxo laminar, sendo obtidos isoladamente o embrião inteiro (FIGURA 5.1 E) e o eixo embrionário (FIGURA 5.1 F).

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4% de Phytigel[®] e suplementado com 0,0; 0,2; 0,4 ou 0,6 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) combinadas com 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). 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 por 15 dias, e depois transferidas para sala de crescimento, onde permaneceram por mais 45 dias, com temperatura de 25°C ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria sob 52 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiância e oito horas de escuro.

Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a regeneração de embriões zigóticos inteiros (EZ) e eixos embrionários (EE). O comprimento da parte aérea (CPA), o número de folhas (NF) e a ausência ou presença de raízes (RZ) por plântula foram obtidos aos 90 dias de cultura *in vitro*.

5.2.3. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4 (dois tipos de explantes x quatro concentrações de ANA), totalizando 8 tratamentos. Para a variável regeneração, cada unidade experimental foi constituída por dez repetições com dois tubos de ensaio, contendo um explante cada. Para o restante das avaliações, foram consideradas apenas as observações em que a variável em estudo era presente.

As médias das variáveis foram transformadas em raiz quadrada de Y + 0,5 e submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05), e para o efeito da concentração de ANA foram estimadas equações de regressão. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

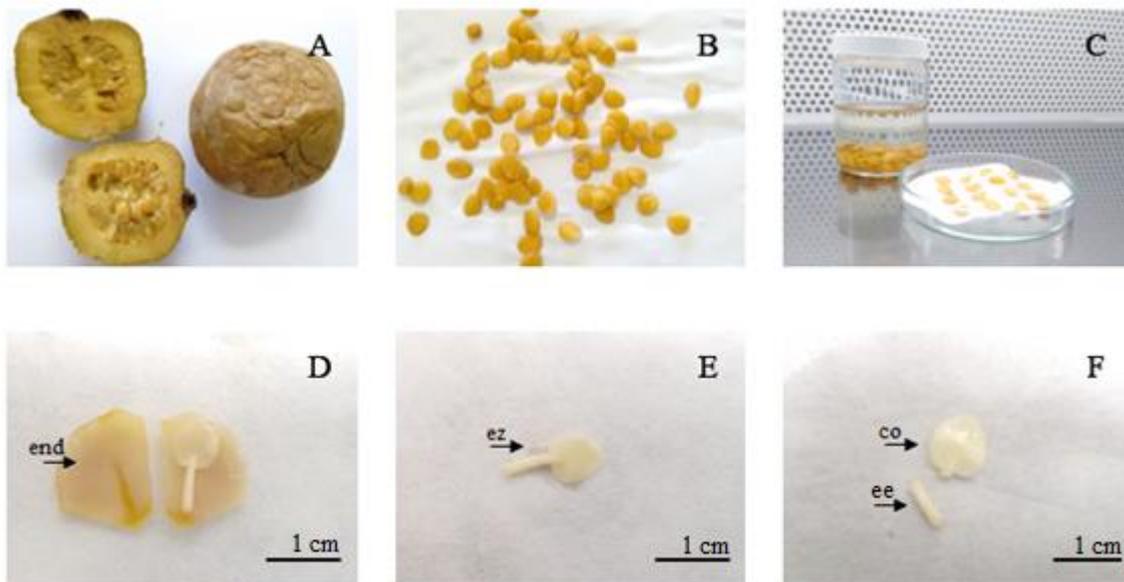


FIGURA 5.1 – Extração, assepsia de sementes e excisão dos embriões zigóticos de jenipapeiro: A – Frutos maduros; B – Sementes após o beneficiamento; C - Assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar; D – Detalhe do embrião zigótico no endosperma (end); E – Embrião inteiro (ez) com cotilédone e eixo embrionário; F – Cotilédone (co) e eixo embrionário (ee) separados.

5.3. Resultados e Discussão

A interação tipo de explante e concentração de ANA não foi significativa para a porcentagem de regeneração. No entanto, o efeito isolado desse regulador de crescimento vegetal foi responsivo na regeneração de embriões inteiros e dos eixos embrionários de jenipapeiro (ANEXO 5.1).

A porcentagem de regeneração apresentou um comportamento linear positivo para ambos os tipos de explante. Na ausência do ANA, a porcentagem de regeneração foi de 40% para o embrião inteiro e 20% para o eixo embrionário. Com o aumento da concentração desse regulador, houve um incremento na taxa de regeneração, para 70% (FIGURA 5.2).

A presença de ANA no meio de cultivo em combinação com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP pode gerar um estímulo inicial para o desenvolvimento dos embriões. Resultados similares foram reportados por Léo et al. (2002) e Leite et al. (2014), nos cultivos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), respectivamente.

Não houve efeito significativo do tipo de explante na porcentagem de regeneração. Para o embrião inteiro, a porcentagem média de regeneração foi de 52,5% e para o eixo embrionário de 47,5%.

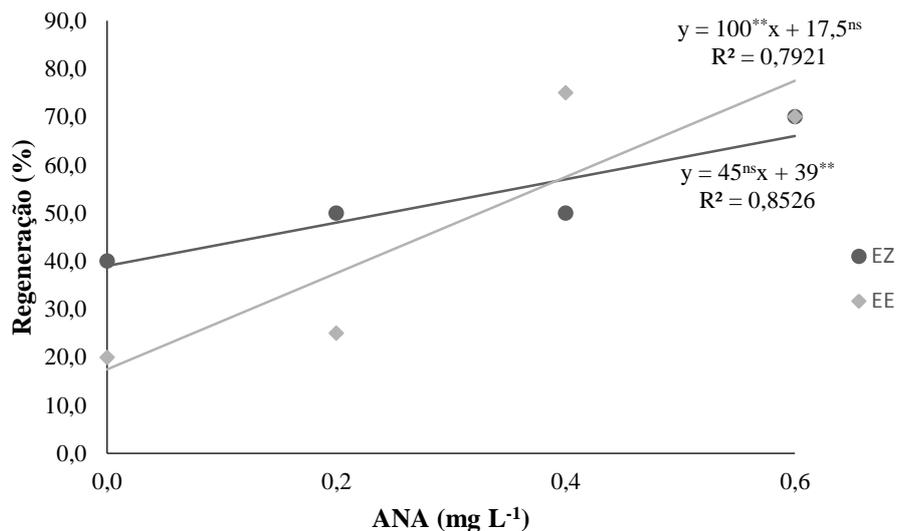


FIGURA 5.2 – Porcentagem de regeneração de explantes de embriões zigóticos inteiros (●) e eixos embrionários (◆) de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

As citocininas regulam diversos processos celulares, incluindo a expansão dos cotilédones em dicotiledôneas (TAIZ & ZEIGER, 2013). Os cotilédones, por vez, funcionam como uma reserva nutricional que irá manter o embrião, até o seu desenvolvimento em plântula, quando essa passa a ser autotrófica (LÉDO et al., 2008). Com a retirada desse tecido, o eixo embrionário pode demandar um tempo extra para estabelecer uma relação com o meio de cultivo, o que pode retardar ou impedir a regeneração do mesmo (FIGURA 5.3). Entretanto, o eixo embrionário seria uma opção potencial para uso em protocolos de criopreservação, considerando-se que a sua dimensão reduzida facilitaria nas etapas de desidratação.

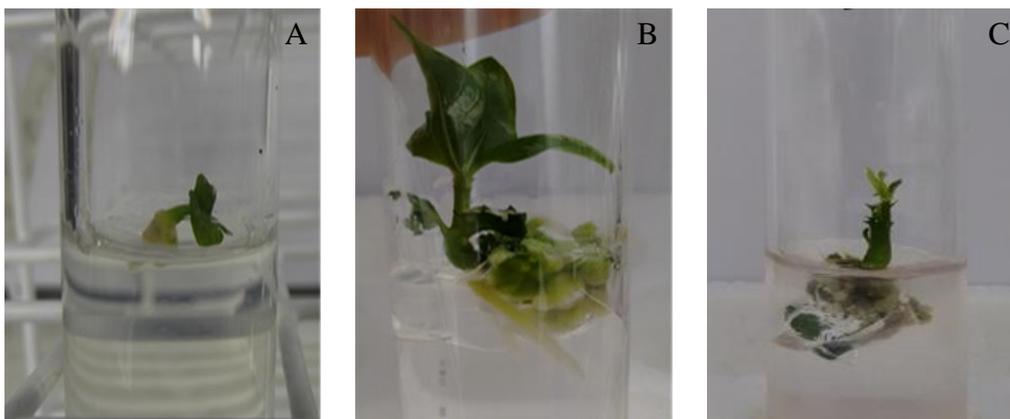


FIGURA 5.3 A – Embrião zigótico com formação de parte aérea, aos 30 dias de cultivo; B – Plântula oriunda do cultivo de embrião zigótico inteiro, aos 90 dias de cultivo; C – Plântula oriunda do cultivo de eixo embrionário, aos 90 dias de cultivo.

A interação tipo de explante e concentração de ANA e os fatores isolados não apresentaram efeito significativo para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA),

número de folhas (NF) e ausência ou presença de raízes (RZ) aos 90 dias de cultivo *in vitro* (ANEXO 5.2).

O comprimento da parte aérea apresentou comportamento quadrático positivo na presença de ANA. Verificou-se redução do comprimento da parte aérea com o aumento da concentração de ANA, obtendo-se um maior crescimento (25,42 mm) na ausência desse regulador (FIGURA 5.4). Considerando-se os explantes isoladamente, o embrião zigótico inteiro teve um incremento médio em altura de 20,14 mm e o eixo embrionário de 14,09 mm.

As auxinas são hormônios importantes para a manutenção da dominância apical. Quando as concentrações endógenas são altas, pode ocorrer um desequilíbrio no balanço auxina e citocinina e, conseqüentemente a inibição na emissão de brotações (TAIZ & ZEIGER, 2013). Esse resultado é corroborado por Rezende et al. (2011), que constataram maior crescimento (24,40 mm) da parte aérea de embriões somáticos de café (*Coffea arabica* L.), na ausência de reguladores de crescimento vegetal. Da mesma forma, Fonseca et al. (2014) verificaram redução do comprimento dos brotos a partir do aumento progressivo das concentrações de BAP no cultivo de embriões inteiros de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.).

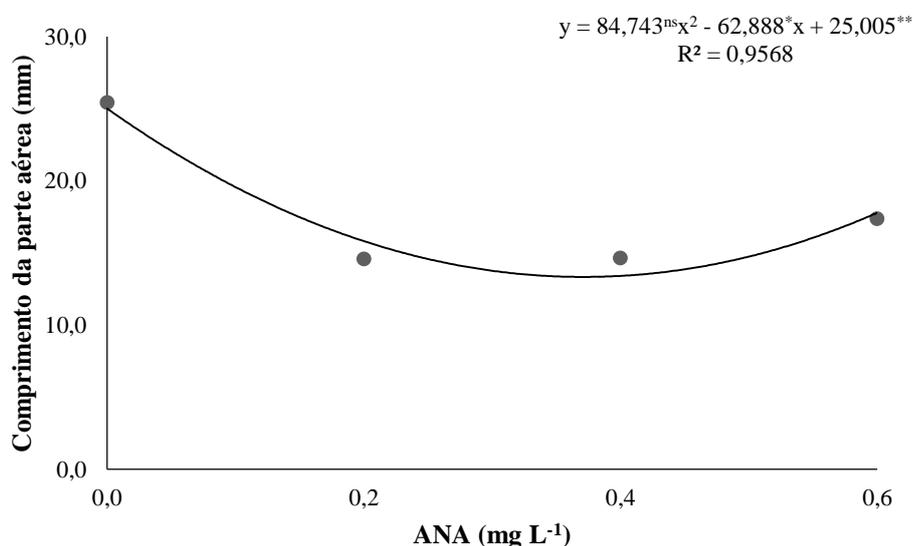


FIGURA 5.4 – Comprimento da parte aérea em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

O mesmo comportamento quadrático positivo foi observado para a variável número de folhas, com o ponto mínimo de 0,39 mg L⁻¹ de ANA (FIGURA 5.5). O aumento da concentração de ANA promoveu uma redução acentuada no número de folhas até 0,4 mg L⁻¹ havendo um ligeiro aumento na concentração de 0,6 mg L⁻¹. A média de folhas obtidas em plântulas regeneradas a partir do embrião inteiro foi de 6,0 por explante, e para o eixo embrionário, 3,0 por explante, na ausência de ANA.

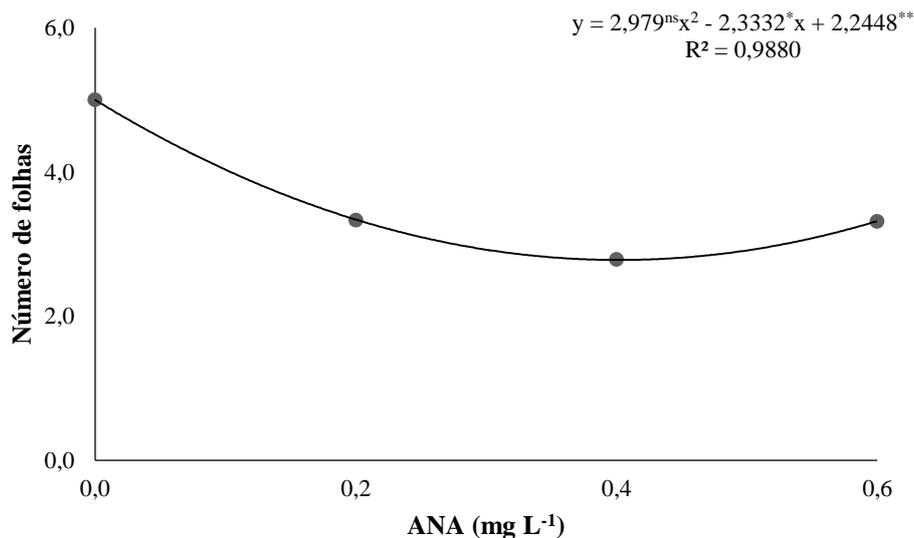


FIGURA 5.5 – Número de folhas em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

Observou-se ainda, que o aumento da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP resultou no crescimento atrofiado da parte aérea, tanto em plântulas provenientes de embriões inteiros (FIGURA 5.6 A), como daquelas oriundas do eixo embrionário (FIGURA 5.6 B). A combinação desses reguladores de crescimento, também inibiu o desenvolvimento por completo da parte aérea dos explantes oriundos de embriões zigóticos de jenipapeiro, que apresentaram formação de calo na sua superfície, principalmente para o eixo embrionário nas concentrações de 0,4 e 0,6 mg L⁻¹ (FIGURA 5.6 C e FIGURA 5.6 D).

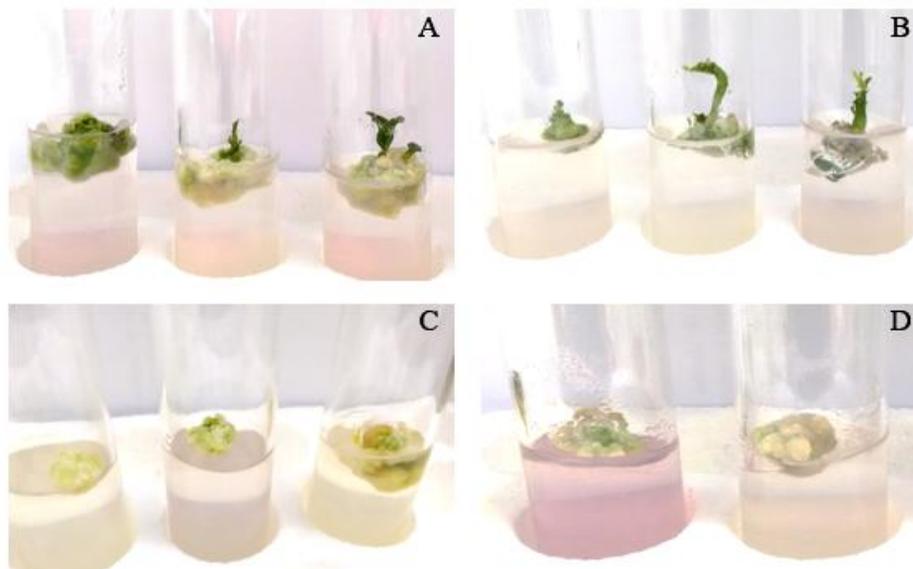


FIGURA 5.6 A – Parte aérea atrofiada em plântula oriunda de embrião inteiro; B – Parte aérea atrofiada em plântula oriunda de eixo embrionário; C – Superfície do explante eixo embrionário com calo compacto (Tratamento com 0,4 mg L⁻¹ de ANA com 1,0 mg L⁻¹ de BAP); D – Superfície do explante eixo embrionário com calo compacto (Tratamento com 0,6 mg L⁻¹ de ANA com 1,0 mg L⁻¹ de BAP).

Não houve efeito significativo da interação tipo de explante e ANA, nem dos fatores isolados na ausência ou presença de raízes. Para o embrião inteiro e eixo embrionário registrou-se um comportamento linear positivo, com 21,06% de raízes na presença de 0,6 mg L⁻¹ de ANA (FIGURA 5.7). A presença de raízes para o embrião inteiro foi de 14,29% e para o eixo embrionário, 5,26%.

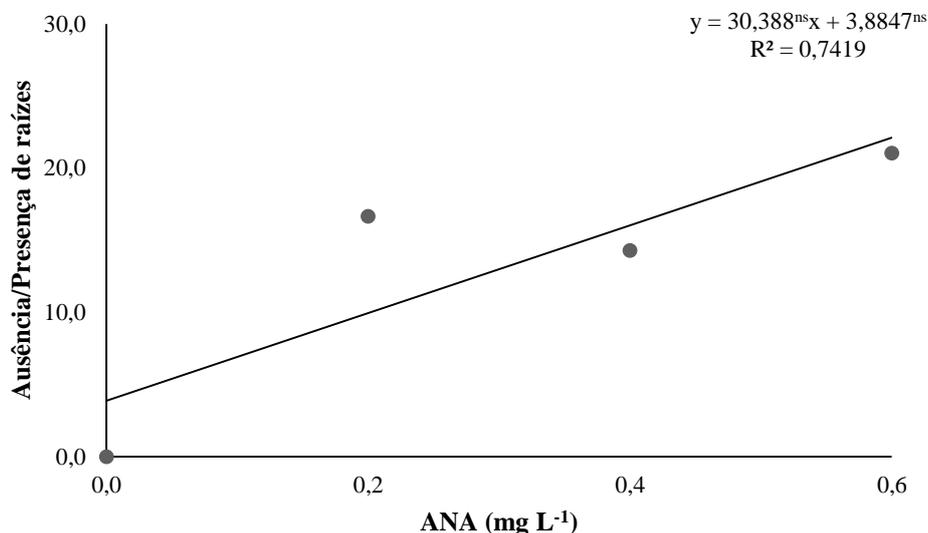


FIGURA 5.7 – Ausência/presença de raízes em explantes de embriões zigóticos de jenipapeiro em função da concentração de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo (**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

Observou-se que o aumento progressivo nas concentrações de 0,4 e 0,6 mg L⁻¹ de ANA com 1,0 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura, resultando num expressivo número de plântulas com formação de calos compactos na base dos explantes. A formação de calos está associada ao balanço entre auxinas e citocininas (TAIZ & ZEIGER, 2013). Em estudos recentes com jenipapeiro, Almeida et al. (2015) relataram a formação de calos em segmentos nodais e foliares inoculados em meio MS com 4,0 e 8,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), e na presença de 1,77 mg L⁻¹ de BAP para explantes foliares, apenas.

Apesar de não ser uma rota preferencial, a calogênese tem servido de base para estudos relacionados a embriogênese somática e a produção de metabólitos secundários *in vitro*, a partir de diversos tipos de explantes (GONÇALVES & ROMANO, 2013; NOGUEIRA et al., 2007).

Considerando as respostas diferenciadas obtidas nesse trabalho, novos estudos devem ser conduzidos buscando o aprimoramento da expressão morfogênica de embriões zigóticos de jenipapeiro.

5.4. Conclusões

É possível a regeneração *in vitro* de jenipapeiro a partir da conversão de embriões zigóticos inteiros em meio MS na ausência ou presença de ANA. A concentração de 0,6 mg L⁻¹ de ANA com 1,0 mg L⁻¹ de BAP promove 70% de regeneração, para os embriões inteiros. O aumento progressivo do ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP induz a formação de calos compactos no eixo embrionário.

5.5. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, C.S.; LÉDO, A.S.; ARAÚJO, A.G.; SILVA, A.V.C.; SILVA JÚNIOR, J.F.; SANTOS, E.; RIBEIRO, M.M.J.; VILANOVA NETA, J.L. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* jenipapeiro. **Scientia Plena**, v.9, n.10, p.1-6, 2013.

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

BAQUE, M.A.; MOH, S.H.; LEE, E.J.; ZHONG, J.J.; PAEK, K.Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30, n.6, p.1255-1267, 2012.

CORRÊA, R.S.; MÉLO FILHO, B.; PINHEIRO, C.Q.; SANTOS, P.F. Floristic woody composition of revegetated mining sites in the Brazilian Federal District. **Bioscience Journal**, v.31, n.3, p.908-922, 2015.

DURÃES, M. C. O.; SALES, N.L.P.; D'ÂNGELO NETO, S.; FIGUEIREDO, M.A.P. Levantamento florístico do estrato arbóreo de três fragmentos de floresta ciliar como subsídio à recomposição da vegetação do Rio Cedro, Montes Claros – MG. **Ciência Florestal**, v.24, n.1, p.47-58, 2014.

DUSSERT, N.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; VASQUEZ, A.N.; HAMON, S. Cryopreservation of coffee. In: TOWIL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. (Eds). **Cryopreservation of plant germoplasma II**. New York: Springer-Verlag, 2002. p.220-232.

ECHEVERRY, L.F.; ZAPATA, S.P.; TORRES, L.F. **Blue colorant derived from *Genipa americana* fruit**. US 7927637 B2, 3 out. 2008, 19 abr. 2011.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. The use of zygotic embryos as explants or *in vitro* propagation: an overview. In: THORPE, T.A.; YEUNG, E.C. (Eds.). **Plant embryo culture: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011. p.229-255.

FERNANDES, F.; RODRIGUES, S. Ultrasound as pre-treatment for drying of genipap (*Genipa americana* L.). **International Journal of Food Engineering**, v.8, n.3, p.1556-3758, 2012.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FONSECA, P.T.; NEPOMUCENO, C.F.; ALVIM, B.F.M.; SANTANA, J.R.F. Resposta morfogênica de embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae) cultivados *in vitro*. **Revista Ceres**, v.61, n.5, p.605-611, 2014.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.31, n.2, p.166-174, 2013.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p.371-393.

LÉDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIEIRA, G.S.S.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.2, p.147-154, 2007.

LÉDO, A.S.; BLANK, A.F.; BARBOZA, S.B.S.C.; RANGEL, M.S.A.; LÉDO, C.A.S. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.1-5, 2008.

LÉDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LEITE, M.S.; SILVA, F.G.; PEREIRA, F.D.; ALBERTO, P.S.; MONTEIRO-HARA, A.C.B.A. *In vitro* germination of babassu: influence of growth regulators in zygotic embryos. **Acta Scientiarum**, v.36, n.4, p.449-456, 2014.

MAGISTRALI, P.R.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J.M.R.; GASPARIN, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v.35, n.4, p.495-500, 2013.

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.

NASCIMENTO, W.M.O; DAMIÃO-FILHO, C.F. Caracterização morfológica de sementes e plântulas de jenipapeiro (*Genipa americana* L. – Rubiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.1, p.143-147, 1998.

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.

PATEL, A.K.; AGARWAL, T.; PHULWARIA, M.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N.S. An efficient *in vitro* plant regeneration system from leaf of matures plant of *Leptadenia reticulata* (Jeewanti): a life giving endangered woody climber. **Industrial Crops and Products**, v.52, p.499-505, 2014.

PRADA, J.A.; AGUILAR, M.E.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of seeds and embryos of *Jatropha curcas* L. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, n.1, p.172-180, 2015.

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.

REED, B.M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.47, n.1, p.1-4, 2011.

REZENDE, J.C.; CARVALHO, C.H.S.; SANTOS, A.C.R.; PASQUAL, M.; MEDES, A.N.G. Effects of auxins and cytokinins on the development of *Coffea arabica* L. somatic embryos. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.7, n.1, p.1-8, 2011.

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.

SAJINI, K.K.; KARUN, A.; AMAMATH, C.H.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **Cryo Letters**, v.32, n.4, p.317-328, 2011.

SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; LUCENA, M.F.A.; COSTA, J.G.M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.133-142, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.44, n.4, p.457-472, 2014.

ZAPPI, D. *Genipa*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14045>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

6. ARTIGO 2: INDUÇÃO E CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS OBTIDOS DE EXPLANTES FOLIARES E NODAIS DE JENIPEIRO

Periódico submetido (ou a ser submetido): Bioscience Journal

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito do 2,4-D na calogênese de segmentos foliar e nodal de jenipapeiro e adequar curvas de crescimento cinético. Os explantes foram obtidos de plântulas previamente estabelecidas *in vitro* dos acessos NB, SA e SAL. Para a indução da calogênese, foram utilizadas diferentes concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹) de 2,4-D. Observou-se que a melhor resposta de indução ocorreu na concentração de 2,0 mg L⁻¹ para calos oriundos de segmentos foliares dos três acessos testados. Para o segmento nodal a resposta entre os acessos foi diferenciada em função da concentração de 2,4-D. A curva de crescimento foi plotada a partir da massa fresca dos calos obtida em intervalos de 10 dias. Através da curva de crescimento estabelecida é possível inferir que ao 40º dia de cultivo, os calos do acesso SA devem ser transferidos para um novo meio de cultura.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., calogênese, reguladores de crescimento vegetal.

ABSTRACT**INDUCTION AND CALLI GROWTH CURVE FROM LEAF AND NODAL EXPLANTS OF GENIPAP**

The aim of this study was to determine the effect of 2,4-D in callus formation of leaf and nodal segments of genipap and to adequate kinetic growth curves. The explants were obtained from seedlings previously established *in vitro* of NB, SA and SAL accesses. For callus induction, different concentrations of 2,4-D were used (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg L⁻¹). It was observed that the best response was induced in a concentration of 2.0 mg L⁻¹ for callus from leaf segments of the three tested accesses. For the nodal segment the response among the accessions was different due to 2,4-D. The growth curve was plotted according to the fresh weight of callus obtained at intervals of 10 days. Through the stablished growth curve it is possible to infer that the 40^o day of culture, the calluses access SA should be transferred to a new culture medium.

Keywords: *Genipa americana* L., callogenesis, plant growth regulators.

6.1. Introdução

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) da família Rubiaceae ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná, de forma dispersa, adaptando-se as mais variadas condições edafoclimáticas (ZAPPI, 2015). Trata-se de uma espécie de relevância socioeconômica, mas que vem sendo explorada de forma extrativista tanto pelas suas características madeireiras quanto pelo seu elevado potencial fitoquímico (BESSA et al., 2013; SANTOS et al., 2011).

A capacidade das plantas em produzir e acumular metabólitos secundários tem sido determinante para o desenvolvimento de tecnologias baseadas no cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos (OKSMAN-CALDENTY & INZÉ, 2004). Células indiferenciadas, denominada de calos, vem sendo cada vez mais utilizados em estudos voltados para a produção de metabólitos secundários. Assim, experimentos já foram conduzidos em explantes foliares e nodais de catingueira (GOMES-COPELAND et al., 2013) e em segmentos foliares de murici pequeno (NOGUEIRA et al., 2007) e de pinhão manso (FEITOSA et al., 2013).

Qualquer tecido vegetal pode ser utilizado na indução de calos, porém tecidos mais jovens possuem maior capacidade em expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Normalmente, o suprimento exógeno com reguladores de crescimento vegetal, principalmente auxinas e citocininas, se faz necessário para estímulo da proliferação celular (NOGUEIRA et al., 2007).

Nesse ponto, o conhecimento sobre a dinâmica de crescimento de calos, ao longo do cultivo *in vitro* pode apoiar o estabelecimento de protocolos otimizados, indicando o momento adequado de transferência para um novo meio (VASCONCELOS et al., 2012). George (2008) relata que são verificadas através da curva de crescimento seis fases distintas de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionário e declínio.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do 2,4-D na formação de calos a partir de explantes foliares e nodais de *G. americana* e caracterizar a dinâmica de crescimento dos mesmos.

6.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas (LCTP) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Aracaju, Sergipe.

6.2.1. Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliar e nodal de jenipapeiro

Como fonte de explantes foram utilizadas plantas previamente estabelecidas *in vitro* de populações nativas de Núcleo Bandeirante, Distrito Federal (acesso NB 15°51'55.72''S; 47°57'34.59''W), Sabinópolis, Nossa Senhora das Dores, Sergipe (acesso SA 10°36'50.79''S; 37°07'36.05'' W) e Salvaterra, Pará (acesso SAL 0° 45'50.32" S; 48°30'40.44" W). Para obtenção de plântulas, sementes obtidas de frutos maduros foram submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar e posteriormente, inoculadas em meio MS (MURSHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificado com 0,4% de Phytigel® (SÁ, 2014).

Os calos foram induzidos a partir de segmentos foliares e nodais obtidos de plântulas estabelecidas *in vitro*, como descrito anteriormente. Os explantes foram inoculados em placas de Petri (50x10 mm) contendo 20 mL de meio de MS com 30 g L⁻¹

¹ de sacarose e 0,4% de Phytigel[®] e suplementado com 0,0; 2,0; 4,0, 6,0 ou 8,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Para o explante foliar foram utilizadas as mesmas concentrações de 2,4-D em combinação com 1,77 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), conforme Almeida et al. (2015).

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 permaneceram no escuro durante todo o experimento, sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 2°C e umidade relativa do ar média em torno de 70%. Aos 30 e 60 dias, foi avaliada a massa fresca de calos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5x2 (3 acessos, 5 concentrações de 2,4-D e 2 tempos de avaliação), com três repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri com quatro explantes.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Para o efeito da concentração do 2,4-D foram estimadas equações de regressão. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

6.2.2. Estabelecimento da curva de crescimento de calos

Para determinação da curva de crescimento cinético de calos oriundos de explantes foliares e nodais de jenipapeiro, foram selecionadas para cada explante a concentração de 2,4-D onde ocorreu maior produção de calos.

Os calos foram pesados, em balança de precisão, a partir do dia da inoculação (tempo 0), em intervalos de dez dias, durante 60 dias, utilizando-se três repetições por período de coleta, com cada repetição constituída por uma placa de Petri com quatro explantes. O percentual de crescimento dos calos foi determinado a partir da equação (VASCONCELOS et al., 2012):

$$\% \text{ de crescimento} = \frac{(Pf - Pi)}{(Pf)} * 100$$

Onde, Pi corresponde a massa fresca inicial e Pf a massa fresca final de calos.

A curva de crescimento foi plotada a partir da média das três repetições em cada tempo (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias) de determinação de massa fresca.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares de jenipapeiro

Houve efeito significativo da interação tripla Acesso x Concentração x Tempo para a massa fresca de calos obtidos a partir de explantes foliares de jenipapeiro (ANEXO 6.1).

Para a variável massa fresca de calos, a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D proporcionou os maiores valores em combinação com 1,77 mg L⁻¹ de BAP para os acessos SA e SAL e na concentração de 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, para o acesso NB, aos 30 dias. Concomitantemente, a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D foi melhor para os três acessos, aos 60 dias, com destaque para o acesso SA, com uma produção de 0,2223 g, que diferiu estatisticamente dos acessos NB e SA (TABELA 6.1).

TABELA 6.1 – Massa fresca de calos (g) oriundos de segmento foliar dos acessos Núcleo Bandeirante (NB), Sabinópolis (SA) e Salvaterra (SAL) em função da concentração de 2,4-D aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

2,4-D (mg L ⁻¹)	NB	SA	SAL
Massa fresca (g) aos 30 dias			
0,0	0,0146 ^a	0,0195 ^a	0,0180 ^a
2,0	0,0338 ^a	0,0554 ^a	0,0320 ^a
4,0	0,0284 ^a	0,0278 ^a	0,0229 ^a
6,0	0,0341 ^a	0,0342 ^a	0,0281 ^a
8,0	0,0223 ^a	0,0154 ^a	0,0223 ^a
CV (%)	47,53		
2,4-D (mg L ⁻¹)	NB	SA	SAL
Massa fresca (g) aos 60 dias			
0,0	0,0206 ^a	0,0247 ^a	0,0221 ^a
2,0	0,0959 ^c	0,2223 ^a	0,1508 ^b
4,0	0,0485 ^a	0,0653 ^a	0,0796 ^a
6,0	0,0941 ^{ab}	0,0621 ^b	0,1417 ^a
8,0	0,0436 ^a	0,0162 ^a	0,0336 ^a
CV (%)	47,53		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O balanço entre auxinas e citocininas tende a ser eficiente na indução de calos. Para Azevedo (2003), a melhor resposta de indução de calogênese em explantes foliares de copaíba foi obtida em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, onde verificou-se um acúmulo de biomassa de 0,0092 g. Indução de calos em resposta à combinação entre AIB e BAP também foram relatadas por Feitosa et al. (2013), para o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

No entanto, esses resultados contradizem os obtidos por Almeida et al. (2015), quanto a significância entre a interação de 2,4-D e BAP na formação de calos em explantes foliares de jenipapeiro. Segundo esses autores, a maior porcentagem de calogênese para explantes foliares de jenipapeiro foi observada na presença de 8,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (89,50%) ou de 2,0 mg L⁻¹ de BAP (85,29%) para o acesso SIR (Siriri, Sergipe). Provavelmente, as variações nas respostas estejam ligadas aos diferentes genótipos de jenipapeiro utilizados em ambos os trabalhos. Resultados semelhantes foram reportados por Santos et al. (2003), para *Coffea arabica* cv Rubi, que obtiveram 67% de produção de calos na presença de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Aos 30 dias de cultivo, a massa fresca de calos do acesso NB apresentou um comportamento quadrático, com ponto máximo na dose de 4,5 mg L⁻¹ de 2,4-D (0,0344 g). Para os acessos SA e SAL a mesma variável foi explicada por uma equação cúbica, com o ponto máximo de 2,52 mg L⁻¹ (0,0476 g) e 2,53 mg L⁻¹ (0,0285 g) de 2,4-D, respectivamente (FIGURA 6.1).

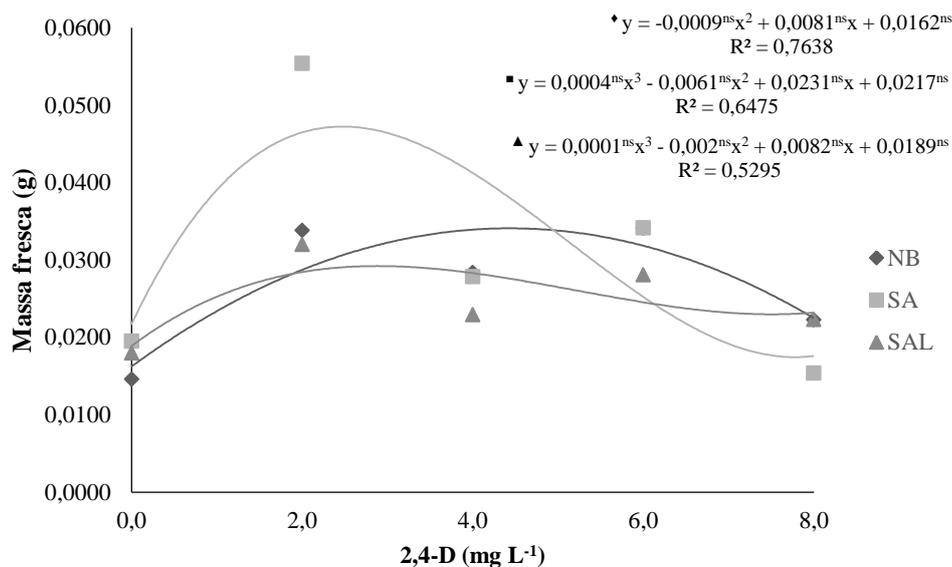


FIGURA 6.1 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L., aos 30 dias de cultivo. (♦ Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

Independente da concentração de 2,4-D, a maior indução de calo ocorreu entre 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* para os acessos em estudo. O comportamento da variável massa de calos foi quadrático para os acessos NB e SAL e cúbica para o acesso SA (FIGURA 6.2). Para o acesso NB, foi observada maior indução de massa fresca na presença de 4,45 mg L⁻¹ de 2,4-D (0,0844 g) e para o acesso SAL na concentração de 4,04 mg L⁻¹ de 2,4-D (0,1337 g). O acesso SA se destacou por apresentar maior acúmulo de massa fresca, na concentração de 2,19 mg L⁻¹ (0,1827 g).

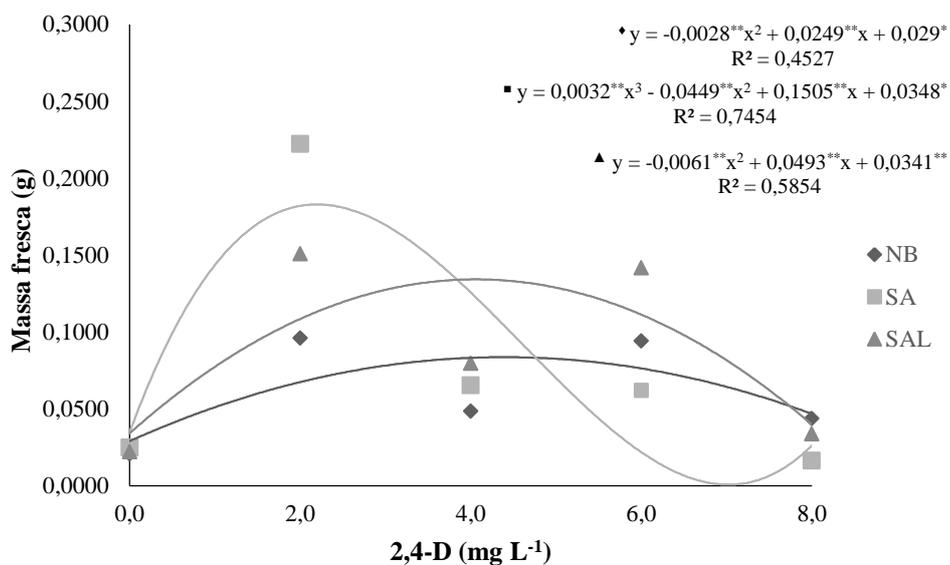


FIGURA 6.2 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L., aos 60 dias de cultivo (♦♦ Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

Verificou-se uma redução drástica na massa fresca para todos os acessos em concentrações elevadas de 2,4-D, que pode estar associada a oxidação ou necrose dos explantes. Reguladores de crescimento possuem um estreito espectro de ação, podendo se tornar tóxicos para os tecidos vegetais em concentrações excessivas, como constatado por Cerqueira et al. (2002), na calogênese de *Tridax procumbens* L. e por Santos et al. (2014), em *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis.

De forma geral, é possível a indução de calos em segmentos foliares de jenipapeiro utilizando-se o 2,4-D em combinação com o BAP. Os calos obtidos a partir de segmentos foliares com a utilização dessa auxina apresentaram textura friável e características não-embriogênicas (FIGURA 6.3).



FIGURA 6.3 – Aspecto geral de calos formados a partir de segmento foliar: A – Acesso NB; B – Acesso SA e C – Acesso SAL, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

6.3.2. Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes nodais de jenipapeiro

Avaliando-se o efeito de 2,4-D no cultivo *in vitro* de diferentes explantes de jenipapeiro em distintos períodos de tempo foi observado significância dos fatores isolados e entre as interações duplas para a massa fresca de calos. Contudo, a interação tripla não foi significativa (ANEXO 6.2).

A massa fresca de calos variou segundo uma regressão cúbica na presença do 2,4-D, com um acréscimo gradativo dessa variável até as concentrações de 2,68; 2,91 e 2,25 mg L⁻¹ de 2,4-D, para os acessos NB, SA e SAL, com um acúmulo de biomassa de 0,2973 g, 0,1346 g e 0,1928 g, respectivamente (FIGURA 6.4). O acesso NB diferiu significativamente dos acessos SA e SAL, com um acréscimo de massa fresca de 0,1947 g.

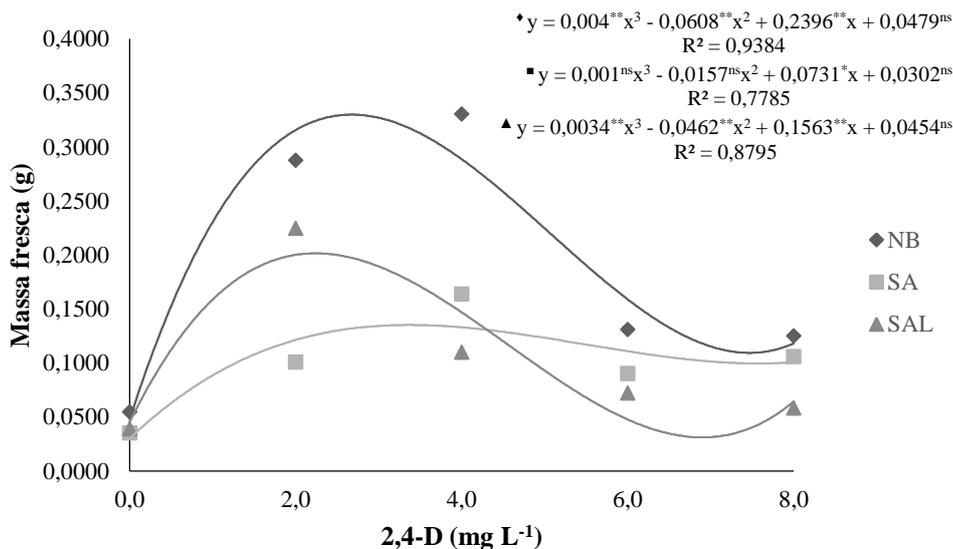


FIGURA 6.4 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. (** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

Aos 30 dias de cultivo, observa-se que a produção de biomassa não difere estatisticamente entre os acessos, entretanto, aos 60 dias houve maior indução no acesso NB. Considerando-se os acessos, em função do tempo, observa-se que não houve incremento significativo da massa de calos dos 30 aos 60 dias de cultivo *in vitro* para os acessos SA e SAL (TABELA 6.2).

TABELA 6.2 – Massa fresca de calos oriundos de segmento nodal dos acessos Núcleo Bandeirante (NB), Sabinópolis (SA) e Salvaterra (SAL) aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

Dias	Acessos		
	NB	SA	SAL
	Massa fresca (g)		
30	0,1208 ^{ab}	0,0843 ^{aA}	0,0823 ^{aA}
60	0,2687 ^{aA}	0,1103 ^{bA}	0,1195 ^{bA}
CV (%)	46,57		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diferenças genotípicas desempenham um papel significativo na calogênese, como demonstrado em café por Rezende et al., (2011). Em parte, essas diferenças correspondem a variação nos níveis endógenos dos reguladores de crescimento dos explantes, que associada as condições de cultivo influenciam na formação e desenvolvimento do calo (SMITH, 2013). Em estudos conduzidos por Sá (2014) o acesso NB foi classificado como um grupo distinto quando comparado com outros acessos e apresentou superioridade quanto a micropropagação.

Considerando-se os tempos de avaliação, a massa fresca de calos apresentou um comportamento cúbico, com pontos máximos de 2,91 mg L⁻¹ e de 2,50 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 30 e 60 dias, respectivamente (FIGURA 6.5).

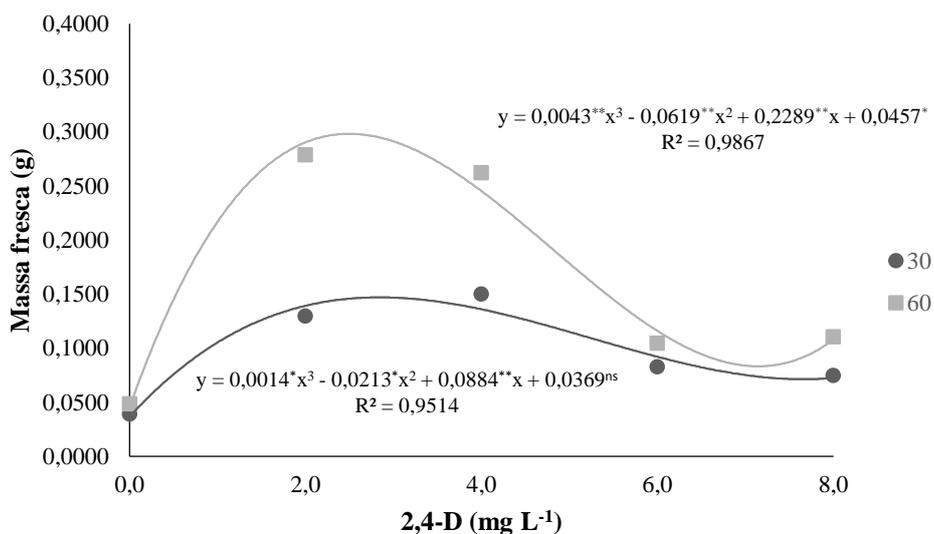


FIGURA 6.5 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L., aos 30 (●) e 60 (■) dias de cultivo. (* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo).

A formação de calos em segmentos nodais de jenipapeiro teve uma relação direta com a concentração de 2,4-D e com o tempo de cultivo *in vitro* em meio de indução. Esses resultados corroboram com Almeida et al. (2015), que observaram uma porcentagem de calogênese de 87,50% oriundos de explantes nodais de jenipapeiro, quando cultivados em meio MS, com 4 mg L⁻¹ de 2,4-D. Em concentrações elevadas de 2,4-D também foi detectada a oxidação e necrose de calos.

O tempo de 60 dias promoveu maior acúmulo de massa fresca, na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D para o acesso NB e SA e de 2,0 de mg L⁻¹ para o acesso SAL, com destaque para o acesso NB, que apresentou um acúmulo de massa fresca de 0,1947 g, diferindo estatisticamente dos outros dois. Os calos obtidos a partir de segmentos nodais com a utilização dessa auxina também apresentaram textura friável e características não-embriogênicas (FIGURA 6.6).



FIGURA 6.6 – Aspecto geral de calos formados a partir de segmento nodal: A – Acesso NB; B – Acesso SA e C – Acesso SAL, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

6.3.3. Estabelecimento da curva de crescimento de calos

Para estabelecimento da curva de crescimento cinético oriundos de explantes foliar e nodal de *G. americana* até os 60 dias de cultivo *in vitro* foram selecionadas as concentrações de 2,4-D de cada acesso que mais contribuíram para o acúmulo de massa fresca de calos, em valor absoluto, conforme Tabela 6.1.

O aspecto geral do padrão de crescimento de calos a partir de explantes foliares de jenipapeiro inoculados em meio MS na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,77 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, para os acessos NB, SA e SAL, aos 60 dias de cultivo, está representado na Figura 6.7.

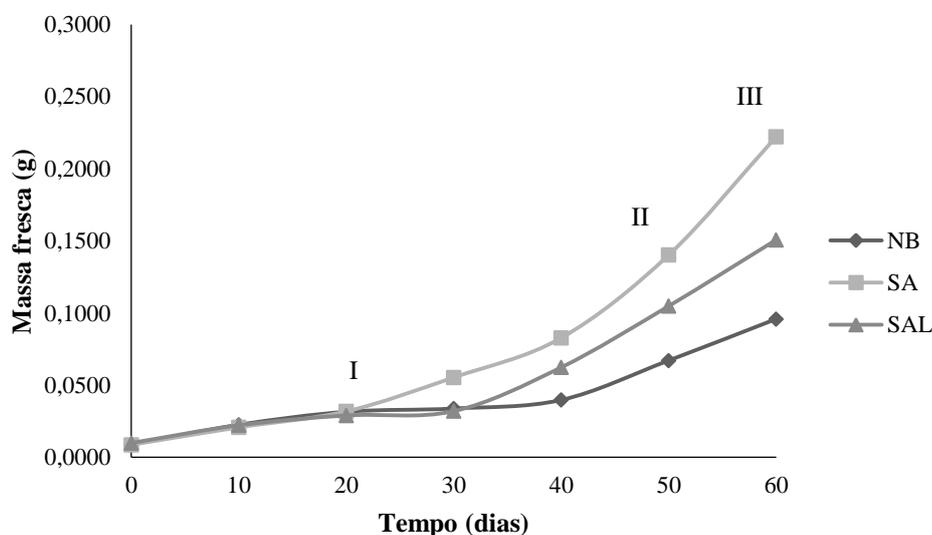


FIGURA 6.7 – Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L. dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), inoculados em meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,77 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP aos 60 dias de cultivo. I – Fase lag, II – Fase exponencial e III – Fase linear.

De forma geral, observou-se um crescimento linear, com tendência de ganho de massa em função do aumento do tempo de cultivo. No período analisado (60 dias), constatou-se a presença de três fases de crescimento distintas, a lag (I), a exponencial (II) e a linear (III).

A fase lag ocorreu até o 10º dia de cultivo, apresentando um percentual de crescimento de 57%, para o acesso NB, 58% para o acesso SA e 55%, para o acesso SAL. Essa fase varia de acordo com a espécie estudada. Feitosa et al. (2013) verificaram que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), a fase lag ocorre até o 15º dia de cultivo. Santos et al. (2003), no entanto, observaram a ocorrência dessa fase até o 42º dia após a inoculação de segmentos foliares de café (*Coffea arabica* cv. Rubi).

A fase de crescimento exponencial, período em que ocorre máxima divisão celular, ocorreu do 10º ao 50º dia de cultivo, apresentando o maior percentual de crescimento de calos para o acesso SA (79%), em relação ao SAL (78%) e o NB (63%). Santos et al. (2008) observou ocorrência dessa fase entre o 28º ao 63º dia de cultivo em calos de segmentos foliares de café (*Coffea canephora* L. cv. Apotã). Em calos de segmentos foliares de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), essa fase foi observada entre o 15º e o 35º dia de cultivo (VASCONCELOS et al., 2012).

A fase de crescimento linear corresponde ao intervalo entre o 50º e 60º dia, após a inoculação, o que representa um incremento de 28% para o acesso NB, 18% para o acesso SA e de 31% para o acesso SAL.

Para calos oriundos de explantes nodais, foram selecionadas as concentrações de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D para os acessos NB e SA e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D para o acesso SAL (FIGURA 6.8).

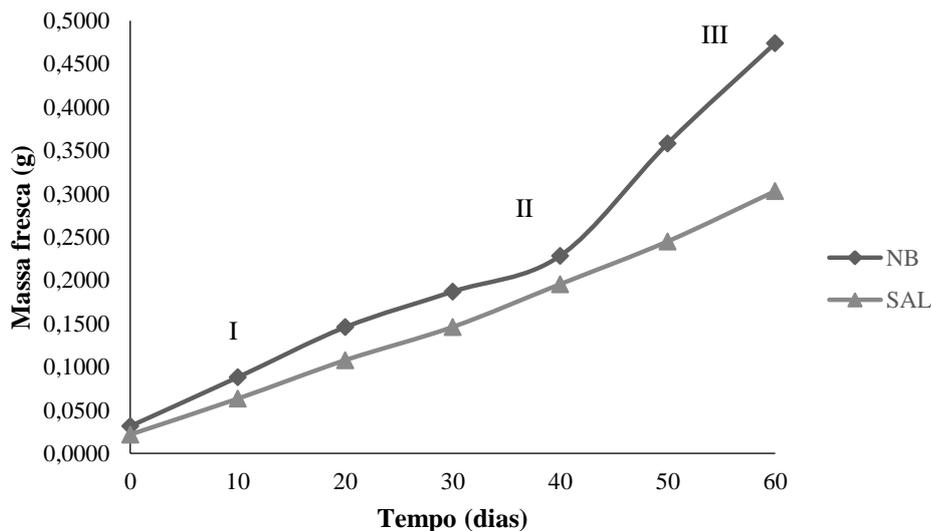


FIGURA 6.8 – Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. do acesso NB (◆), inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e do acesso SAL (▲), inoculado em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase *lag*, II – Fase exponencial, III – Fase linear.

A dinâmica de crescimento de calos de jenipapeiro oriundos de explantes nodais apresentou um padrão diferenciado entre os acessos testados. Para os acessos NB e SAL, houve um comportamento linear sendo que a fase *lag*, na qual células do explante preparam-se para divisão celular, ocorreu até o 10º dia de inoculação. Os incrementos registrados foram de 60% para o acesso NB e de 65% para o acesso SAL.

A partir desse ponto, verifica-se um acúmulo de biomassa acentuado até o 40º dia, que corresponde a fase de crescimento exponencial, com 61% de incremento para o acesso NB e 51%, para o acesso SAL. Até o 60º, observou-se o período de crescimento linear, com incremento de 51% para o acesso NB e 32% para o acesso SAL.

O acesso SA apresentou uma curva de crescimento sigmoide com cinco fases distintas: *lag*, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (FIGURA 6.9).

A fase *lag* ocorreu até o 10º dia após a inoculação, representando um aumento de 77% no crescimento. A fase exponencial ocorreu entre o 10º e o 20º dia, com incremento de 47%, seguida pela fase de crescimento linear, até o 30º dia, com acúmulo de biomassa equivalente a 27%.

Entre o 30º e 40º dia observou-se o período de desaceleração do crescimento, marcado pela redução do incremento de matéria fresca até o 60º dia de cultivo, o que indica que não está mais ocorrendo a síntese de biomassa. Azevedo (2003) considera que a transferência dos calos para novos meios de cultura deve ser realizada durante a fase de desaceleração. Para calos de aroeira do sertão esse processo deve ocorrer ao 56º dia de cultivo (VASCONCELOS et al., 2012); para calos de café a repicagem deve ser efetuada ao 70º dia de cultivo (SANTOS et al., 2008).

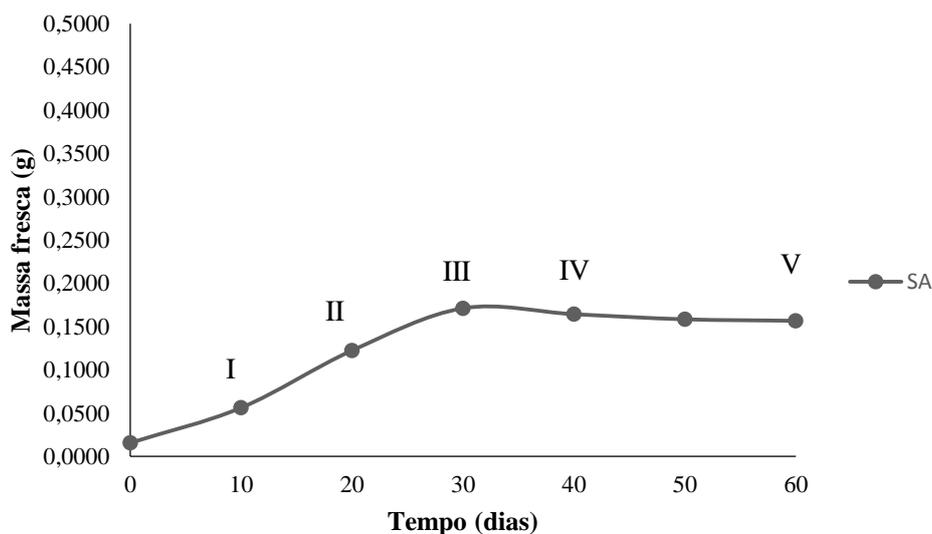


FIGURA 6.9 – Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. do acesso SA (■) inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase lag, II – Fase exponencial, III – Fase linear, IV – Fase de desaceleração e V – Fase estacionária.

Calos provenientes de segmentos foliares apresentaram um crescimento mais lento em relação aos de segmentos nodais. Os resultados obtidos com a curva de crescimento de calos não foram satisfatórios. Assim, estudos abrangendo um maior período de avaliação deverão ser considerados futuramente para diferentes acessos de *G. americana* a fim de melhor caracterização da dinâmica de crescimento celular em condições de cultivo *in vitro*.

6.4. Conclusões

É possível a indução de calos em segmentos foliares de jenipapeiro em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 1,77 mg L⁻¹ de BAP. Calos obtidos a partir de segmentos nodais dos acessos NB e SA tiveram melhor resposta de indução na concentração de 4,0 mg L⁻¹ e SAL, em 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. A dinâmica de crescimento dos calos oriundos de explantes foliares de jenipapeiro dos acessos NB, SAL e SA e explantes nodais dos acessos NB e SAL apresentam padrão linear, com três fases distintas de crescimento. O acesso SA apresenta padrão sigmoide com 5 fases distintas de crescimento.

6.5. Referências bibliográficas

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

AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calo e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U; QUIRINO, M.S; CHAGAS JUNIOR, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.692-707, 2013.

CERQUEIRA, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R.; CASTRO, N.E.A.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.2, p.301-308, 2002.

FEITOSA, L.S.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M.P.; BLANK, A. F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v.29, n.2, p.370-377, 2013.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure: background. In: MERRIOTT, E.F.G.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. (Eds). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2008. p.1-28.

GOMES-COPELAND, K.K.P.; LÉDO, A.S.; MACHADO, C.A.; DAVID, J.P.L. Indução da calogênese em *Caesalpinia pyramidalis* T. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 3., 2013, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. p.72-77.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa- CNPH, 1998. p.183-260.

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.

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.

OKSMAN-CALDENTEY, K-M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p.433-440, 2004.

REZENDE, J.C.; CARVALHO, C.H.S.; PASQUAL, M. SANTOS, A.C.R.; CARVALHO, S.M.; Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. **Ciência Rural**, v.41, n.3, p.384-389, 2011.

SÁ, F.P. **Aplicação de técnicas de cultura de tecidos para a propagação e criopreservação de jenipapeiro**. 2014, 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE, 2014.

SANTOS, A.R.F.; SILVA-MANN, R.S.; FERREIRA, R.A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, v.35, n.2, p.213-220, 2011.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.P.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.571-577, 2003.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.P.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v.20, n.1, p.22-29, 2008.

SANTOS, M.R.A.; ROCHA, J.F.; PAZ, E.S.; SMOZINSKI, C.V.; NOGUEIRA, W.O.; GUIMARÃES, M.C.M. Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.10, n.2, p. 41-46, 2014.

SMITH, R.H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 3 Ed. California: Academic Press, 2013.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

ZAPPI, D. *Genipa*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14045>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

ANEXOS

Anexo 5.1 Resumo da análise de variância da porcentagem de regeneração (%R) de explantes de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), em função das concentrações de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM
Explante (E)	1	0,011692 ^{ns}
ANA (A)	3	0,198748 ^{**}
Explante vs. ANA	3	0,069827 ^{ns}
Resíduo	72	0,061248
CV (%)	25,60	

^{**}Significativo a 1% de probabilidade; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

Anexo 5.2 Resumo da análise de variância do comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF) e ausência/presença de raízes (RZ) de explantes de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), em função das concentrações de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 90 dias de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM		
		CPA	NF	RZ
Explante (E)	1	0,432479 ^{ns}	0,258179 ^{ns}	0,023468 ^{ns}
ANA (A)	3	0,319677 ^{ns}	0,498129 ^{ns}	0,030220 ^{ns}
Explante vs. ANA	3	0,321179 ^{ns}	0,332881 ^{ns}	0,034080 ^{ns}
Resíduo	49	0,157585	0,222394	0,033191
CV (%)		27,37	24,18	23,36

^{**}Significativo a 1% de probabilidade; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(X + 0,5)^{1/2}$.

Anexo 6.1 Resumo da análise de variância da massa fresca de calos obtidos a partir de explantes foliares de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) dos acessos NB, SA e SAL, em função das concentrações de 2,4-D em combinação com 1,77 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 e 60 dias de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM
Acesso	2	0,001003 ^{ns}
2,4-D	4	0,015288 ^{**}
Tempo	1	0,043082 ^{**}
Acesso vs. 2,4-D	8	0,001479 [*]
Acesso vs. Tempo	2	0,001562 ^{ns}
2,4-D vs. Tempo	4	0,008499 ^{**}
Acesso vs. 2,4-D vs. Tempo	8	0,001777 ^{**}
Resíduo	57	0,000544
CV (%)	47,53	

^{**}Significativo a 1% de probabilidade; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Anexo 6.2 Resumo da análise de variância da massa fresca de calos obtidos a partir de explantes nodais de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) dos acessos NB, SA e SAL, em função das concentrações de 2,4-D aos 30 e 60 dias de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM
Acesso	2	0,082005 ^{**}
2,4-D	4	0,090642 ^{**}
Tempo	1	0,098830 ^{**}
Acesso vs. 2,4-D	8	0,015205 ^{**}
Acesso vs. Tempo	2	0,029162 ^{**}
2,4-D vs. Tempo	4	0,014717 ^{**}
Acesso vs. 2,4-D vs. Tempo	8	0,006754 ^{ns}
Resíduo	53	0,003607
CV (%)	46,57	

^{**}Significativo a 1% de probabilidade; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.