

Foto: Ana da Silva Léo



Propagação in vitro de Jenipapeiro (*Genipa americana* L.)

Ana Silva Léo
Francielen Paola de Sá
Ana Veruska Cruz da Silva
Annie Carolina Araújo de Oliveira
Caroline de Araujo Machado
Adrielle Naiana Ribeiro Soares
Leila Albuquerque Resende de Oliveira
Rafael Mota de Gondra

A família Rubiaceae possui 550 gêneros e aproximadamente 9.000 espécies. O gênero *Genipa* tem apenas duas espécies: *G. americana* L. e *G. infundibuliformis* Zappi & Semir, com a primeira sendo nativa e cultivada em toda a região neotropical, desde o México até a Patagônia, e a segunda sendo encontrada no Centro-Sul do Brasil (DELPRETE et al., 2005). Devido a abundante produção de sementes, rusticidade, adaptabilidade e, frutos atrativos para fauna, a espécie pode ser empregada em programas de enriquecimento de áreas de preservação permanente e recuperação de áreas degradadas (VIEIRA; GUSMÃO, 2006). O jenipapo apresenta grande demanda por parte do mercado de frutas frescas, por ser uma fruta saborosa, de baixa perecibilidade e com excelentes qualidades nutricionais (DANTAS et al., 2009).

O jenipapeiro é uma espécie intermediária em relação ao armazenamento de sementes e, seu processo germinativo é lento e com baixa uniformidade (FERREIRA et al., 2007) o que dificulta sua propagação por sementes. Assim, a cultura de tecidos apresenta-se como estratégia alternativa para a propagação em larga escala e em curto espaço de tempo, de mudas com qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (PINHAL et al., 2011).

Resultados obtidos por Rocha et al. (2008) e Sá et al. (2016) apontam a eficiência da propagação in vitro do jenipapeiro. A fase de aclimatização é uma das mais limitantes do processo de regeneração, em que ocorre a maioria das perdas e dessa forma o enraizamento in vitro e seleção de substratos tornam-se condições indispensáveis para o sucesso da técnica.

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

²Bióloga, mestre em Agroecossistemas, doutoranda da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

³Bióloga, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

⁴Bióloga, mestre em Agricultura e Biodiversidade, doutoranda da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁵Bióloga, mestre em Agroecossistemas, doutoranda da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁶Engenheira-agrônoma, mestre em Fitotecnia, doutoranda da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁷Engenheira Florestal, mestre em Agricultura e Biodiversidade, São Cristóvão, SE

⁸Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Tiradentes, Aracaju, SE

Assim, o objetivo desta publicação é descrever a metodologia de obtenção de plântulas in vitro, a multiplicação e o enraizamento in vitro a partir de segmentos nodais de jenipapeiro, a partir de estudos realizados pelo Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE.

Obtenção de sementes para a formação de plantas doadoras de explantes

a) As sementes que originam as plântulas assépticas doadoras de explantes devem ser extraídas de frutos sadios e maduros (Figura 1A).

Frutos no estágio de maturação “de vez” podem ser coletados e a extração das sementes ser efetuada quando maduros.

b) Os frutos devem ser abertos e a polpa com sementes retirada e colocada em uma peneira de palha debaixo de água corrente (Figura 1B). A polpa deve ser macerada até a completa lavagem das sementes (Figuras 1C e 1D). Em seguida, as sementes mantidas sobre papel absorvente ou jornal à sombra por 24 horas até sua secagem (Figuras 1E e 1F). Após esse período, devem ser descartadas as de mau formação ou doentes.



Figura 1. Procedimento para extração de sementes: a) frutos maduros de jenipapeiro; b) abertura dos frutos; c) retirada da polpa do fruto; d) lavagem da polpa; e) sementes lavadas; e f) sementes secas.

Preparo de meio de cultura de germinação, desinfestação e inoculação de sementes para obtenção de plântulas de jenipapeiro assépticas

a) O meio de cultura MS deve ser preparado com 3% de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para 5,8 (Tabela 1). Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos de vidro transparente com capacidade de 200 mL a 250 mL, do tipo “maionese” (30 mL/frasco) ou em

tubos de ensaio 20 mm x 150 mm (25 mL/tubo), vedados com tampas plásticas ou de papel alumínio, e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kgf cm⁻², em temperatura de 121 °C;

b) Em câmara de fluxo laminar, as sementes devem ser desinfestadas com a imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto, imersão em hipoclorito de sódio a 2%-2,50% por 20 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril;

c) As sementes devem ser inoculadas, na posição horizontal ou vertical, com auxílio de pinça individualmente nos tubos de ensaio, ou em número de três a quatro em frascos de vidro;

d) As culturas devem ser mantidas até a germinação e desenvolvimento da parte aérea (Figura 2A), por um período de 60 dias, em sala de crescimento com temperatura controlada de $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sob condições de fotoperíodo de 12 horas ($52 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância).

Tabela 1. Componentes do meio de cultura básico MS.

Componentes	Concentração	
	mg.L ⁻¹	mM
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,030
H ₃ BO ₃	6,2	0,100
KI	0,83	0,0005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,0001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0001
FeEDTA		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,10
Vitaminas		
Tiamina - HCl	0,1	0,0003
Piridoxina - HCl	0,5	0,0024
Ácido nicotínico	0,5	0,0040
Mio-Inositol	100	0,05
Sacarose	30.000	87,6

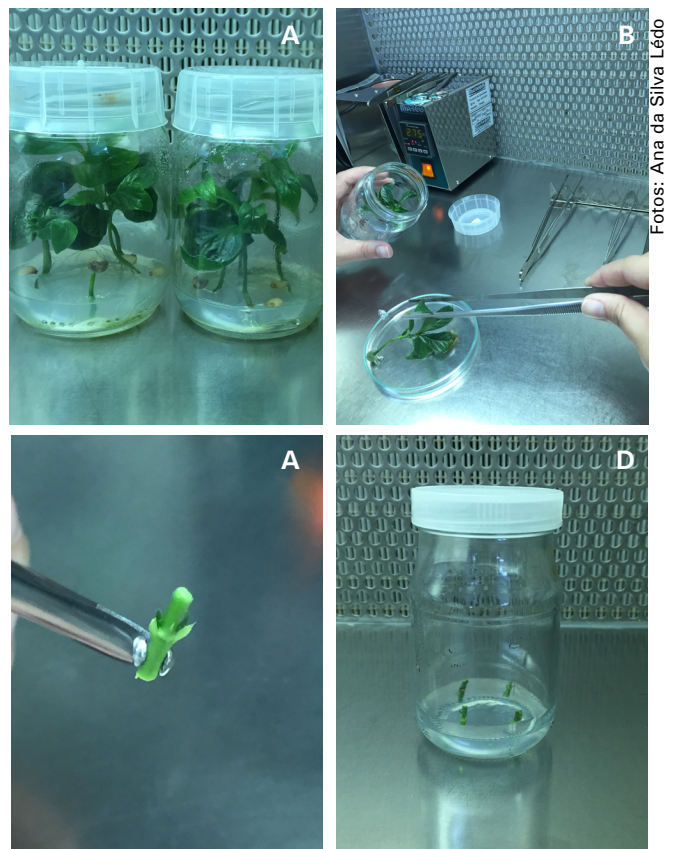
Fonte: Murashige e Skoog, 1962.

Preparo de meio de cultura de multiplicação, excisão, inoculação e repicagem de segmentos nodais de jenipapeiro

a) O meio de multiplicação para segmentos nodais deve ser preparado com a concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS com 3% de sacarose e 1 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), e gelificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para 5,8;

b) Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos de vidro transparente com capacidade de 200 mL a 250 mL, do tipo “maionese” (30 mL/frasco), vedados com tampas plásticas e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kgf/cm², em temperatura de 121 °C;

c) Os segmentos nodais com 1 cm de comprimento, aproximadamente, deve ser excisados de plântulas assépticas de mangabeira de 60 dias de idade, com auxílio de pinça e bisturi (Figuras 2B e 2C) e inoculados diretamente na posição vertical na quantidade de quatro a cinco segmentos/frasco (Figura 2D);



Fotos: Ana da Silva Léo

Figura 2. Fase de multiplicação: a) plântulas assépticas doadoras de explantes; b) excisão de segmentos nodais; c) segmento nodal com 1 cm de comprimento; d) inoculação de segmentos nodais.

d) As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sob condições de fotoperíodo de 12 horas ($52 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância);

e) A cada 30 a 45 dias o meio de cultura deve ser renovado e as culturas repicadas até no máximo seis vezes.

Preparo de solução de AIB e meio de cultura na fase de enraizamento de brotações de jenipapeiro

- a) O meio de cultura da fase enraizamento para brotações deverá ser preparado com a concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS com 3% de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para 5,8;
- b) Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos de vidro transparente com capacidade de 200 mL a 250 mL, do tipo “maionese” (30 mL/frasco), vedados com tampas plásticas e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kg f cm⁻², em temperatura de 121 °C;
- c) Para a indução do enraizamento, as bases das brotações adventícias de jenipapeiro obtidas a partir de segmentos nodais na fase de multiplicação, devem ser imersas durante vinte segundos, em soluções estéreis de ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 400 mg L⁻¹ a 600 mg L⁻¹ (Figura 3A) e transferidas, em número máximo de três, para frascos contendo meio de cultura descrito anteriormente (Figura 3B);

Pré-aclimatização e aclimação das brotações enraizadas

- a) Após o enraizamento in vitro as brotações são retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente para limpeza dos resíduos do meio de cultura (Figura 4A), sendo suas raízes aparadas com auxílio de tesoura em 2 cm de comprimento (Figura 4B);
- b) Em seguida, as mudas são transferidas bandejas ou copos de plásticos (300 mL) podendo conter dois tipos de substratos: S1- composto por areia lavada + pó da casca do coco seco, na proporção 1:1, em volume e ou S2- substrato comercial a base de casca de pinus, turfa, vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes (Figura 4C);
- c) Os substratos devem ser previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, sob pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos;
- d) Durante 15 dias as plantas devem permanecer em sala de crescimento (Figura 4D) ou estufa agrícola à temperatura de 26 °C ± 2 °C, umidade relativa do ar em torno de 70%, fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria, sob 52 μmol m⁻² s⁻² de irradiância e 12 horas de escuro, com regas diárias de água e, uma vez por semana, com meio MS líquido.

Fotos: Ana da Silva Léo

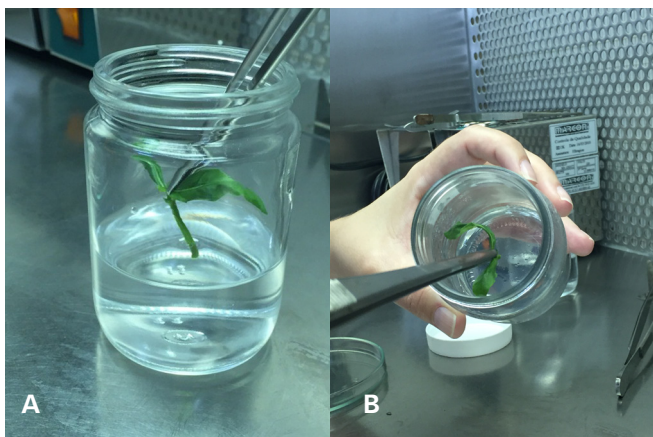


Figura 3. Indução de enraizamento: a) imersão da base da brotação adventícia em solução estéril de AIB; e b) transferência para meio de enraizamento.

- d) As culturas devem ser mantidas por até 90 dias em sala de crescimento com temperatura controlada de 27 °C ± 2 °C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas (52 μmol m⁻²s⁻¹ de irradiância), até a formação do sistema radicular, em torno de 30 a 45 dias.



Fotos: Rafael Mota de Gondra

Figura 4. Pré-aclimatização em sala de crescimento de mudas de jenipapeiro: a) lavagem das raízes em água corrente; b) corte das raízes; c) transferência das brotações enraizadas para substrato; e d) plantas em pré-aclimatização em sala de crescimento.



Foto: Ana da Silva Ledo

Figura 5. Acclimação de mudas de jenipapeiro em viveiro.

e) Após os 15 dias de pré-acclimação, as plantas são transferidas para viveiro com sistema de irrigação por nebulização e 60% de sombreamento (Figura 5), até seu completo desenvolvimento quando estão prontas para o plantio definitivo no campo, em torno de 90 a 120 dias.

Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, à FAPITEC/SE, à CAPES e ao CNPq, pelo aporte de recursos financeiros e concessão de bolsa.

Referências

DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS, R. O. S.; SANTOS, L. S. L. Jenipapo. In: SANTOS-SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. (Ed.) **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 275- 291, 2009.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiáceas. In: REIS, A. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense: gêneros de A-G**. Itajaí: Herbário 'Barbosa Rodrigues'. 2005. p. 345-842, vol. II.

FERREIRA, W. R.; RANAL, M.; DORNELES, M. C.; SANTANA. Crescimento de mudas de *Genipa americana* L. submetidas a condições de pré-semeadura. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1026-1028, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PINHAL, H. F.; ANÁSTACIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicação da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento in vitro e acclimação de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 760-774, 2008.

SÁ, F. P.; LEDO, A. S.; SILVA, A. V. C.; AMORIM, J. A. E. ; PASQUAL, M. In vitro propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, p. 155-163, 2016.

VIEIRA, F. A.; GUSMÃO, E. Efeitos de giberilinas, fungicidas e do armazenamento na germinação de sementes de *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Cerne**, Viçosa, v. 12, n. 2, p. 137-144, 2006.

Comunicado Técnico, 195

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju - SE
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



1ª edição
PDF (2016)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Elio Cesar Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Tratamento das ilustrações: Joyce Feitoza Bastos
Editoração eletrônica: Joyce Feitoza Bastos