

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
149**

**Calogênese in vitro a partir de
explantes de jenipapeiro**

*Annie Carolina Araújo de Oliveira
Fernanda Vieira Santana
Caroline de Araújo Machado
Leila Albuquerque Resende de Oliveira
Francine Ferreira Padilha
Ana Veruska Cruz da Silva
Josué Francisco da Silva Junior
Ana da Silva Léo*

**Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2020**

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Avenida Beira Mar, nº 3250,
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: +55 (79) 4009-1300
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Ronaldo Souza Resende

Secretário-Executivo
Ubiratan Piovezan

Membros
Amaury da Silva dos Santos
Ana da Silva Lédo
Anderson Carlos Marafon
Joézio Luiz dos Anjos
Julio Roberto Araujo de Amorim
Lizz Kezzy de Moraes
Luciana Marques de Carvalho
Tânia Valeska Medeiros Dantas
Viviane Talamini

Supervisão editorial
Aline Gonçalves Moura

Normalização bibliográfica
Josete Cunha Melo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Aline Gonçalves Moura

Foto da capa
Ana da Silva Lédo

1ª edição
Publicação digitalizada (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Calogênese in vitro a partir de explantes de jenipapeiro / Annie Carolina Araújo de
Oliveira... [et al.]. – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2020.

24p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Tabuleiros Costeiros,
ISSN 1678-1961; 149).

1. Jenipapo. 2. Fruta tropical. 3. Crescimento. 4. Desenvolvimento. 5. I.
Oliveira, Annie Carolina Araújo de. II. Machado, Caroline de Araújo Machado. III.
Oliveira, Leila Albuquerque Resende de. IV. Padilha, Francine Ferreira. V. Silva,
Ana Veruska Cruz da. VI. Silva Júnior, Josué Francisco da. VII. Ledo, Ana da Silva.
VIII. Série.

CDD 634.6 Ed. 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões.....	22
Agradecimentos.....	22
Referências	22

Calogênese in vitro a partir de explantes de jenipapeiro

Annie Carolina Araújo de Oliveira¹

Fernanda Vieira Santana²

Caroline de Araújo Machado³

Leila Albuquerque Resende de Oliveira⁴

Francine Ferreira Padilha⁵

Ana Veruska Cruz da Silva⁶

Josué Francisco da Silva Junior⁷

Ana da Silva Lédo⁸

Resumo – O jenipapeiro é caracterizado pela produção de metabólitos bioativos com amplo potencial farmacológico como os iridóides. O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito da auxina 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) na calogênese de segmentos foliar e nodal de jenipapeiro e caracterizar curvas de crescimento cinético para futuros estudos de quantificação de metabólitos secundários. Os explantes foram obtidos de brotações de plântulas estabelecidas in vitro dos acessos NB, SA e SAL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 3x5x2, com três acessos (NB, SA, SAL), cinco concentrações de 2,4-D (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 mg L⁻¹) e dois tempos de avaliação para calos frescos (30 e 60 dias). Houve indução de calos em todos os tratamentos testados. Observou-se que a melhor resposta de indução ocorreu na concentração de 2,0 mg L⁻¹ para calos oriundos de

¹ Engenheira Florestal, doutora em Agricultura e Biodiversidade, Aracaju, SE.

² Engenheira Florestal, mestra em Agricultura e Biodiversidade, Aracaju, SE.

³ Bióloga, doutora em Agricultura e Biodiversidade, Aracaju, SE.

⁴ Engenheira Florestal, mestra em Agricultura e Biodiversidade, Aracaju, SE.

⁵ Bióloga, doutora em Biotecnologia, pesquisadora do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁷ Engenheiro-agrônomo, mestre em Ciências Agrárias, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁸ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

segmentos foliares. 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 até 60 dias. Através da curva de crescimento estabelecida é possível inferir que os calos do acesso SA devem ser transferidos para um novo meio de cultura aos 40 dias de cultura.

Termos para indexação: *Genipa americana* L., auxina, calos, reguladores de crescimento vegetal.

In vitro callogenesis from genipapo explants

Abstract – The genipap is characterized by the production of bioactive metabolites with wide pharmacological potential such as iridoides. The aim of this study was to determine the effect of the auxin 2,4-D (2,4-diclorophenoxyacetic) in calli formation from leaf and nodal segments of genipap and to characterize its growth curve for future studies of quantification of secondary metabolites. Explants were obtained from shoots established from in vitro seedlings of NB, SA and SAL accessions. The experimental design was completely randomized in a 3x5x2 factorial with three accessions (NB, SA, SAL), five concentrations of 2,4-D (0.0; 2.0; 4.0, 6.0 or 8.0 mg L⁻¹) and two times of measurement for calli fresh weight (30 and 60 days). There was callus formation in all treatments tested. It was observed that the best response for callus induction from leaf segments was with 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D. For nodal segment, the response among the accessions was different due to 2,4-D concentrations. The growth curve was plotted according to the fresh weight of callus obtained at intervals of 10 days up to 60 days. Through the established growth curve, the nodal-derived calli from accession SA should be transferred to a new medium, after 40 days of culture.

Index terms: *Genipa americana* L., auxin, callus, plant growth regulators.

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 às mais variadas condições edafoclimáticas (Zappi, 2020). 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-Caldentey; Inzé, 2004). Células indiferenciadas, denominada de calos, vem sendo cada vez mais utilizadas 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) para a obtenção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, alimentar ou cosmético a partir de cultura de calos. O jenipapeiro é caracterizado pela produção de metabólitos bioativos com amplo potencial farmacológico. Dentre esses, os iridóides são responsáveis pela defesa do vegetal contra pragas, além de possuírem diversas propriedades farmacológicas (VillaSeñor, 2007).

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: latência ou 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 para futuros estudos de quantificação de metabolitos secundários.

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.

Origem dos explantes

Como fonte de explantes foram utilizadas plantas previamente estabelecidas in vitro de populações nativas do Núcleo Bandeirante, Distrito Federal (acesso NB 15°51'55.72" S; 47°57'34.59" W), povoado de 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 (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificado (Sá, 2014).

Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e nodais de jenipapeiro

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 de sacarose e suplementado com 0,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 4,0 mg L⁻¹, 6,0 mg L⁻¹ 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar média em torno de 70%. Aos 30 e 60 dias, foi avaliada a massa fresca de calos.

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 crescimento dos calos foi obtido pelo incremento da massa fresca ao longo do tempo. A variação da massa fresca do calo (VMFC) foi determinada a partir diferença entre a massa fresca inicial e a massa fresca final de calos em cada tempo de leitura.

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

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $3 \times 5 \times 2$ (3 acessos, 5 concentrações de 2,4-D e 2 tempos de avaliação 30 e 60 dias), 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).

Resultados e Discussão

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

Houve efeito significativo dos fatores isolados 2,4-D e tempo, e das interações Acesso x 2,4-D, 2,4-D x Tempo e da interação tripla Acesso x 2,4-D x Tempo para a massa fresca de calos obtidos a partir de explantes foliares de jenipapeiro (Tabela 1).

Tabela 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 F 5%. GL – Graus de liberdade; QM – Quadrado médio; CV – Coeficiente de variação.

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 2).

Tabela 2. 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. CV – Coeficiente de Variação

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 re-

portados 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 1).

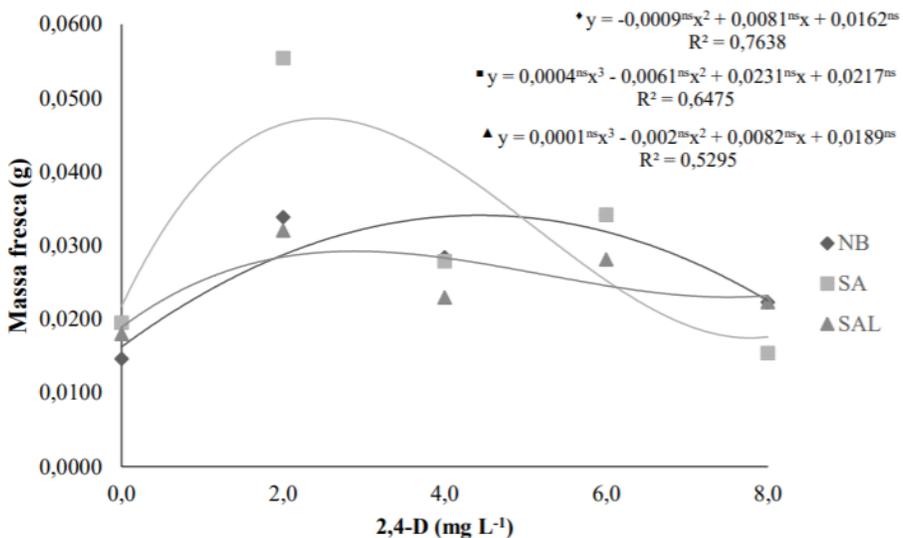


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (♦), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L., aos 30 dias de cultivo. ** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}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

Independente da concentração de 2,4-D, a maior indução de calos 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 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).

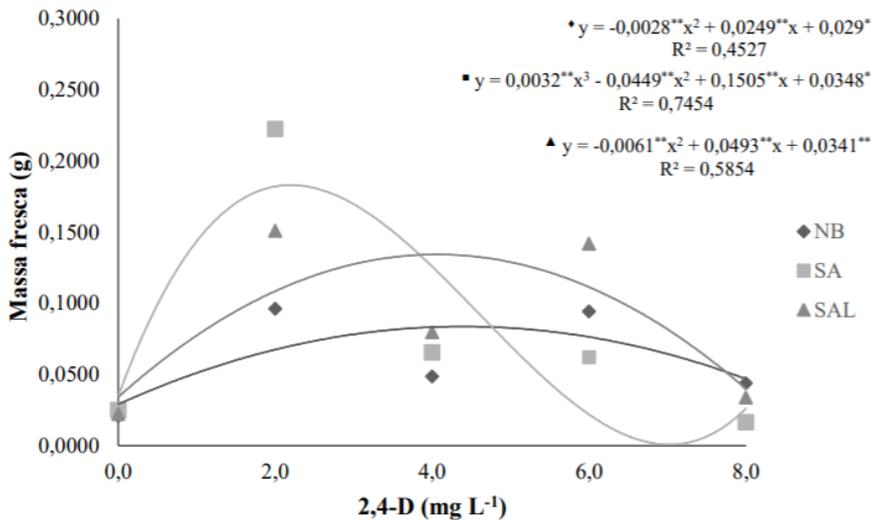


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, sobre a massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L., aos 60 dias de cultivo ** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade; ns Não 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.

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 (Tabela 3).

Tabela 3. 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 F 5%. GL – Graus de liberdade; QM – Quadrado médio; CV – Coeficiente de variação.

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 3). O acesso NB diferiu significativamente dos acessos SA e SAL, com um acréscimo de massa fresca de 0,1947.

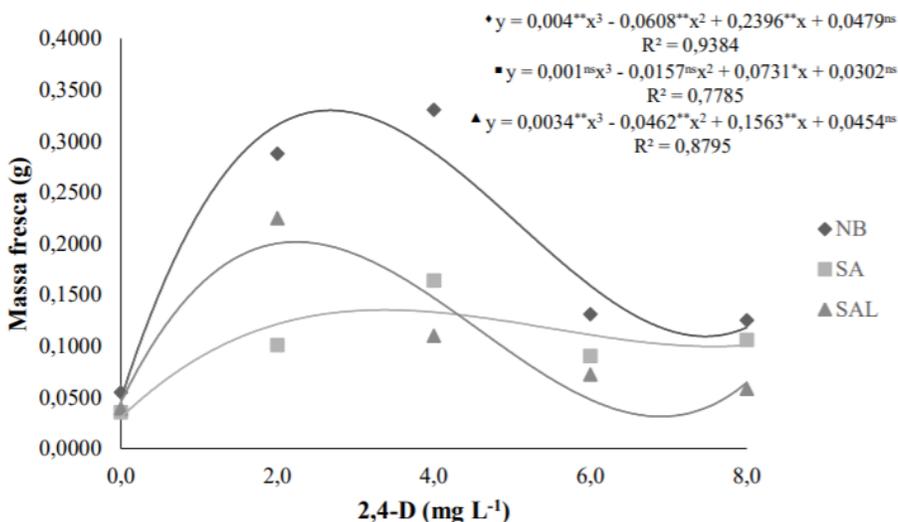


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. cultivado. **Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

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 4).

Tabela 4. 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. CV – Coeficiente de Variação

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 4).

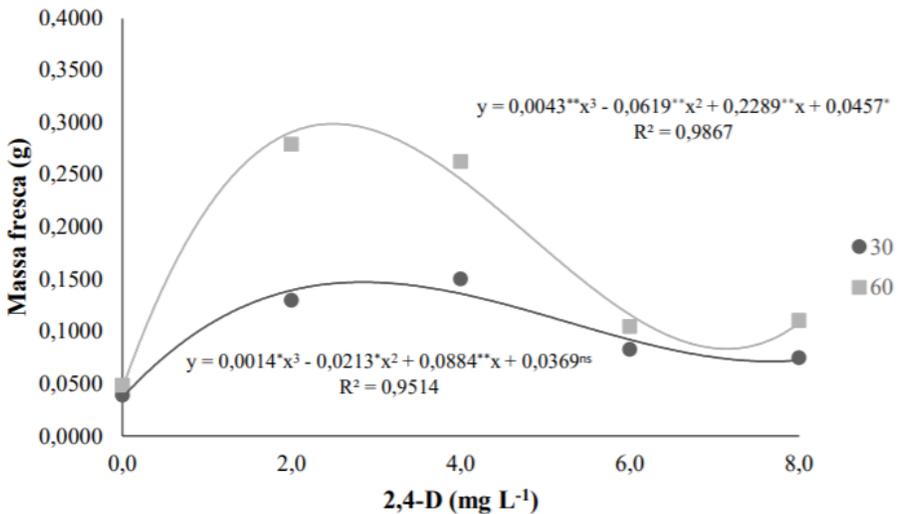


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, na massa fresca (g) de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L., aos 30 (●) e 60 (■) dias de cultivo. **Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

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 $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D para o acesso NB e SA e de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o acesso SAL, com destaque para o acesso NB, que apresentou um acúmulo de massa fresca de $0,1947 \text{ g}$, 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.

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 2.

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 5.

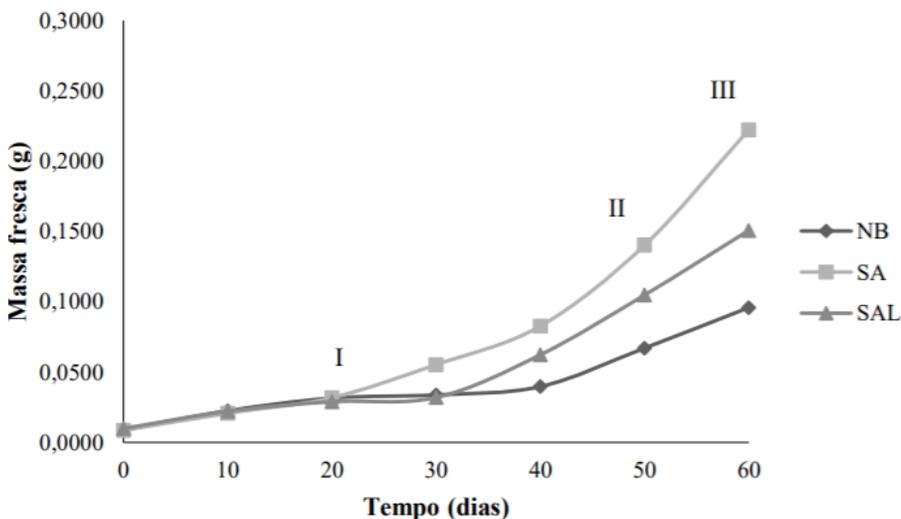


Figura 5. Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos foliares de *Genipa americana* L. dos acessos NB (◆), SA (■) e SAL (▲), inoculados em meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,77 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP aos 60 dias de cultivo. I – Fase lag, II – Fase exponencial 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. Aboatã). 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 mg L⁻¹ de 2,4-D para os acessos NB e SA e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D para o acesso SAL (Figura 6).

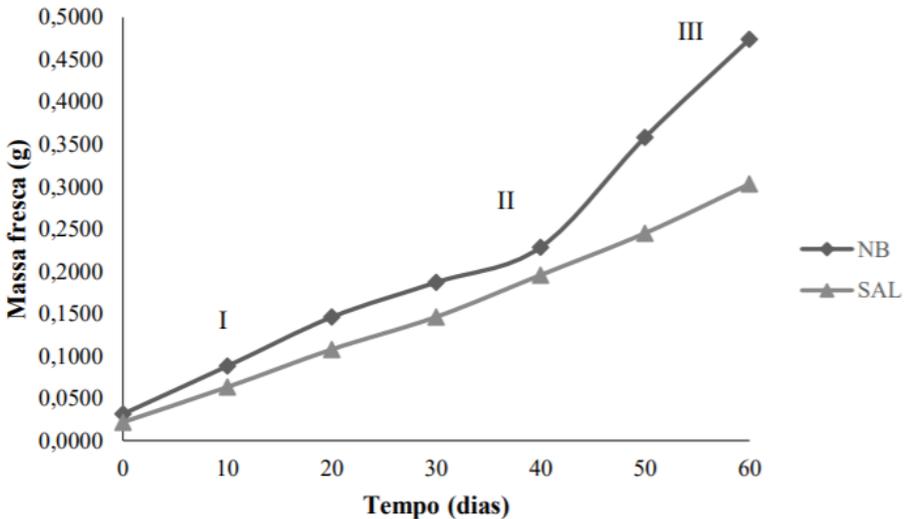


Figura 6. Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. do acesso NB (♦), inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e do acesso SAL (▲), inoculado em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase lag, II – 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 7).

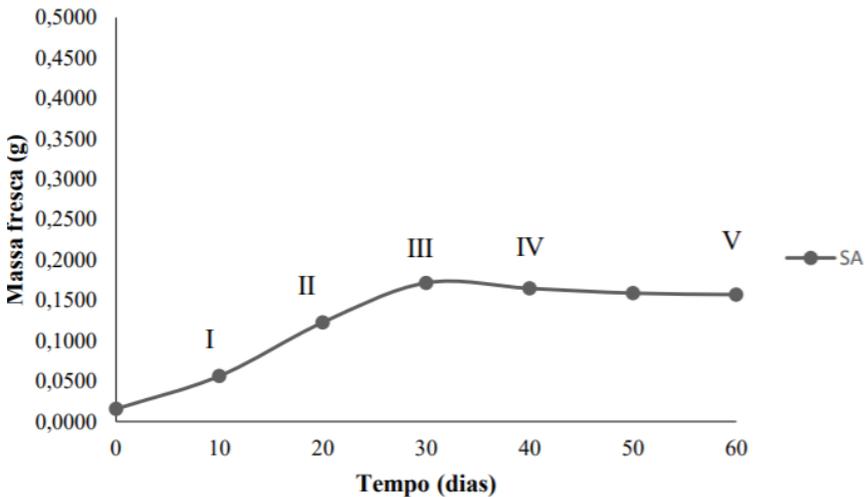


Figura 7. Crescimento cinético de calos formados a partir de segmentos nodais de *Genipa americana* L. do acesso SA (■) inoculado em meio MS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. I – Fase latência - lag, II – Fase exponencial, III – Fase linear, IV – Fase de desaceleração e V – Fase estacionária.

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).

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.

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. Calos provenientes de segmentos foliares apresentam um crescimento mais lento em relação aos de segmentos nodais. Estudos complementares devem ser conduzidos para melhor eficiente da calogênese in vitro.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsas de pós-graduação e ao assistente de pesquisa Inácio Roque de Andrade Junior pelo apoio no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

Referências

- 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 copaiba (*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. (Ed.). **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. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: 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 CALDENTY, 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.; 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.

VILLASEÑOR, I. Bioactivities of Iridoids. Antiinflammatory and Anti-allergy. **Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 307–314, 2007.

ZAPPI, D. Genipa. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: <https://dipeq.jbrj.gov.br/conservacao/lista-da-flora-do-brasil-reflora/> . Acesso em: 25 fev. 2020.



Tabuleiros Costeiros