



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

CRIOPRESERVAÇÃO E SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPAPEIRO

CYNTIA MAIA DO NASCIMENTO

2018



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

CYNTIA MAIA DO NASCIMENTO

CRIOPRESERVAÇÃO E SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPEIRO

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

Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Ana da Silva Léo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL
2018

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

N244c Nascimento, Cyntia Maia do.
Criopreservação e sementes sintéticas de jenipapeiro / Cyntia Maia do Nascimento; orientadora Ana da Silva Lédo. – São Cristóvão, 2018.
53 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)– Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Jenipapo. 2. Criobiologia. 3. Plantas - Nutrição. I. Lédo, Ana da Silva, orient. II. Título.

CDU 582.936.1

CYNTIA MAIA DO NASCIMENTO

CRIOPRESERVAÇÃO E SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPAPEIRO

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 27 de fevereiro de 2018.

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

Prof^a. Dr^a. Kicia Karinne Pereira Gomes
Copeland
Universidade de Brasília

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

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL

A Deus, familiares e amigos.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fornecer saúde, sabedoria, paciência, perseverança e uma família maravilhosa.

À Dra. Ana da Silva Lédo pela orientação, paciência, dedicação e incentivos fornecidos durante o desenvolvimento deste estudo. Sou grata por todos os ensinamentos, que serão lembrados durante toda minha vida profissional.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros que permaneceram entre os anos de 2016 a 2018, obrigada pela amizade, convivência, paciência, companheirismo e apoio para que eu pudesse realizar esta grande etapa da minha vida.

A minha mãe Lelaide Brito Maia por todo o carinho, dedicação e amor. Te amo!

Ao meu pai José Silvanio Oliveira do Nascimento que mesmo de longe torce pelo meu melhor.

A meus irmãos pelo apoio e incentivo dado ao longo de minha vida pessoal e acadêmica, por sempre estarem juntos nos momentos mais precisos.

A meu namorado, Leonardo, pelo amor, carinho, companheirismo, bom humor e generosidade fornecidos ao longo desta caminhada.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar a estrutura física e pessoal para o desenvolvimento deste trabalho.

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

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) pela oportunidade.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutura da Universidade Federal de Lavras e a Fapemig pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo histologia e microscopia eletrônica.

Agradeço a todos que me apoiaram e contribuíram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Aspectos gerais do jenipapeiro.....	2
2.2 Conservação de recursos genéticos de jenipapeiro.....	3
2.3 Aplicação da cultura de tecidos de plantas na conservação em longo prazo de recursos genéticos.....	4
2.4 Sementes sintéticas.....	5
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
4. ARTIGO 1.....	12
TEMPOS DE DESSECAÇÃO NA UMIDADE DE SEMENTES E REGENERAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE JENIPAPEIRO CRIOPRESERVADOS	
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
4.1 Introdução.....	14
4.2 Material e Métodos.....	15
4.2.1 Material vegetal.....	15
4.2.2 Efeito do tempo de dessecação na umidade e viabilidade de sementes de acessos de jenipapeiro.....	15
4.2.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados.....	15
4.2.4 Análises histológicas.....	16
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	16
4.2.6 Análises estatísticas.....	16
4.3. Resultados e Discussão.....	17
4.3.1 Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de acessos de jenipapeiro.....	17
4.3.2 Efeito do tempo de dessecação na germinação e crescimento de acessos de jenipapeiro não criopreservados.....	17
4.3.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados.....	20
4.4 Conclusões.....	24
4.5 Referências Bibliográficas.....	25
5. ARTIGO 2.....	28
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA MATRIZ DE ENCAPSULAMENTO NA REGENERAÇÃO DE SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPAPEIRO	
RESUMO.....	28

ABSTRACT.....	29
5.1 Introdução.....	30
5.2 Material e Métodos	31
5.2.1 Material vegetal.....	31
5.2.2 Características nutricionais da matriz de encapsulamento e do meio de cultura na regeneração.....	31
5.2.3 Enraizamento das brotações oriundas de sementes sintéticas.....	32
5.2.4 Análises estatísticas.....	32
5.3 Resultados e Discussão	32
5.3.1 Características nutricionais da matriz de encapsulamento na regeneração.....	32
5.3.2 Enraizamento das brotações oriundas de sementes sintéticas.....	34
5.4 Conclusões	36
5.5 Referências Bibliográficas.....	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de acessos de jenipapeiro.....	17
2	Efeito do tempo de dessecação na germinação de acessos de jenipapeiro.....	18
3	Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento plântulas do acesso Umbaúba aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . A-comprimento da parte aérea; B- número de folhas e C- comprimento da raiz.....	19
4	Regeneração de eixo embrionário de jenipapeiro após a criopreservação aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . A- acesso Umbaúba; B- acesso Núcleo Bandeirante.....	20
5	Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento de plântulas de jenipapeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> após a criopreservação. A-comprimento da parte aérea; B- comprimento da raiz e C- número de folhas..	21
6	Estruturas do embrião zigótico do jenipapeiro não criopreservado. A-superfície do embrião zigótico: co - cotilédones; ee - eixo embrionário; pr - ponta da radícula; B- superfície do embrião zigótico em microscópio eletrônico de varredura.....	22
7	Corte transversal e eletromicrografias de varredura de eixo embrionário antes e após a criopreservação (NL), com 12 horas de dessecação. A e B- células de eixo embrionário antes NL, C e D- células de eixo embrionário após NL.....	23
8	Corte transversal e eletromicrografias de varredura de eixo embrionário de jenipapeiro antes e após a criopreservação (NL), com 20 horas de dessecação. A e B- eixo embrionário antes NL, C e D- eixo embrionário após NL.....	23
9	Etapas do processo de encapsulamento. A- plântulas de jenipapeiro; B- ápices caulinares; C- ápices imersos em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação por 15 minutos; D- cápsulas descomplexadas e prontas para a inoculação em meio de cultura.....	31
10	Regeneração de sementes sintéticas A - B - C - D - rompimento inicial das capsulas até os 15 dias; E - F - brotações aos 30 e 60 dias.....	34
11	A- calo desenvolvido na base de brotações de sementes sintéticas de jenipapeiro; B- rizogênese em brotações de sementes sintéticas em meio MS sem ácido indolbutírico.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Porcentagem de germinação de acessos de jenipapeiro em diferentes tempos de dessecação.....	18
2	Efeito do tempo de dessecação de sementes do acesso Núcleo Bandeirante no comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRAIZ) e número de folhas (NF) de plântulas aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	20
3	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	20
4	Efeito do acesso no comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CRAIZ) e número de folhas (NF) de eixos embrionários de jenipapeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> após a criopreservação.....	22
5	Influência da constituição da matriz de encapsulamento sobre a porcentagem de regeneração, número de folhas, número de brotações adventícias, comprimento da parte aérea (CPA) de jenipapeiro aos 30 e 60 dias de cultura <i>in vitro</i>	33
6	Número de raízes e comprimento da raiz principal em brotações regeneradas a partir de ápices caulinares encapsulados em diferentes matrizes de encapsulamento de jenipapeiro em meio MS na ausência de ácido indolbutóico.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FAA	Formalina, ácido acético e álcool etílico
MS	Meio de cultura MS de Murashige e Skoog (1962)
WPM	Meio de cultura <i>Wood Plant Medium</i> de Loyd e Mc Cown (1981)
AIB	Ácido indolbutírico
BAP	Benzilaminopurina
bu	Base úmida
PVS2	<i>Plant Vitrification Solution 2</i>

RESUMO

NASCIMENTO, Cyntia Maia do. **CRIOPRESERVAÇÃO E SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPAPEIRO**. São Cristóvão: UFS, 2018. 53p. (Dissertação - Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) *

Atualmente a preservação de recursos genéticos nativos no Brasil tem sido considerada como ação prioritária em diversas instituições de pesquisa. O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é considerado uma frutífera de alto potencial para uso imediato entre as espécies nativas da região Nordeste do Brasil. É uma cultura perene, explorada sob a forma extrativista, cuja conservação de seus recursos genéticos é, sobretudo, baseada em coleções de campo. As coleções de sementes são inviabilizadas devido à fisiologia de suas sementes, já que o comportamento das mesmas durante o armazenamento é intermediário, razão pela qual não toleram a dessecação a níveis extremamente reduzidos. A aplicação das técnicas de criopreservação que compreende a conservação do material vegetal em temperaturas ultrabaixas. Assim, são paralisadas todas as atividades, como divisão celular e reações metabólicas, permitindo o armazenamento do material vegetal por tempo indeterminado. O uso de sementes sintéticas ou sementes artificiais são estratégias complementares à conservação da variabilidade genética existente, e para acelerar a multiplicação de genótipos superiores. O objetivo do trabalho foi aprimorar o conhecimento científico para a conservação de eixos embrionários de jenipapeiro por meio da criopreservação e estudar aspectos nutricionais da matriz de encapsulamento de sementes sintéticas a partir de ápices caulinares.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., conservação, recursos genéticos, encapsulamento.

* Comitê Orientador: Ana da Silva Lédo - Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS (Orientadora).

ABSTRACT

NASCIMENTO, Cyntia Maia do. **CRYOPRESERVATION AND SYNTHETIC SEEDS OF GENIPAP** São Cristóvão: UFS, 2018. 53p. (Thesis – Master of Science in Agriculture and Biodiversity) *

Currently, the preservation of native genetic resources in Brazil has become a priority in several research institutions. Among the native species in the Northeast region of Brazil, the fruit tree *Genipa americana* L. is considered highly promising for immediate use. The conservation of the genetic resources of this perennial crop, exploited by predatory forest extractivism, is mainly based on field collections. Seed collection and storage is hampered by the physiology, since the seed performance during storage is intermediary, particularly for being intolerant to extremely low desiccation levels. In this sense, the application of cryopreservation techniques, which includes the conservation of plant material at ultra low temperature by immersion in liquid nitrogen at -196°C, paralyzes all activities, such as cell division and metabolic reactions, allowing the storage of plant material for an indeterminate period. The application of the synthetic or artificial seed technique is a complementary strategy for the conservation of the existing genetic variability, and acceleration of the propagation of superior genotypes. The objective of this study was to deepen the technical-scientific knowledge about the conservation of embryonic axes of genipap by means of cryopreservation and to study the nutritional aspects of the encapsulation matrix of synthetic seeds derived from shoot tips.

Key-words: *Genipa americana* L., conservation, genetic resources, encapsulation.

* Advising Committee: Ana da Silva Léo – Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS (advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as árvores frutíferas que apresentam potencial de uso socioeconômico imediato, destaca-se a espécie *Genipa americana* L. conhecida popularmente como jenipapeiro. A espécie pertencente à família Rubiaceae, tem origem na América do Sul e Central, podendo ser aproveitada para diversos fins, entre eles a indústria alimentícia, madeireira e medicinal. Além disso, é muito utilizada na arborização urbana, recuperação de áreas degradadas, composição em áreas de preservação permanente e em sistemas agroflorestais (SÁ et al., 2015).

O jenipapeiro possui sementes classificadas como intermediárias, não tolerando dessecação e baixas temperaturas, perdendo o vigor e a viabilidade (SÁ et al., 2015). Devido a isso, a conservação por banco de sementes torna-se inviável e atualmente a estratégia mais utilizada é a coleção de campo, que está sujeita a ataques de pragas e problemas ambientais, dentre outros fatores (SILVA et al., 2010). Sendo assim, é imprescindível a adoção de estratégias complementares de conservação, a fim de evitar ou minimizar a erosão da diversidade genética.

Dentre diversas técnicas biotecnológicas, as oriundas da cultura de tecidos de plantas têm sido amplamente aplicadas como estratégia complementar à conservação da variabilidade genética (PILATTI et al., 2011). O crescimento lento e a criopreservação têm sido empregados para a conservação do material vegetal *in vitro*. O método de conservação por crescimento lento consiste na redução do metabolismo da planta por meio da manipulação do ambiente e das condições de cultivo, e o armazenamento do material ocorre somente a curto ou médio prazo (ENGELMANN, 2011). A técnica de criopreservação, por meio do armazenamento do material em nitrogênio líquido à temperatura ultrabaixa (-196°C), paralisa todas as atividades como divisão celular e reações metabólicas, permitindo a sua conservação por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2004).

A técnica de conservação de plantas a partir de eixos embrionários, utilizando a tecnologia de sementes sintéticas ou sementes artificiais, é uma ferramenta promissora no âmbito da agricultura. Principalmente para espécies onde a conservação a partir de sementes naturais torna-se problemática (MONDO; CICERO, 2008), como é o caso do jenipapeiro.

Existem poucas informações sobre a conservação do jenipapeiro à temperatura ultrabaixa. Estudos publicados por Santos et al. (2015) indicaram a viabilidade da criopreservação de eixos embrionários a partir da dessecação.

Os objetivos do trabalho foram aprimorar o conhecimento científico para a conservação de eixos embrionários de jenipapeiro por meio da criopreservação e estudar aspectos nutricionais da matriz de encapsulamento de sementes sintéticas a partir de ápices caulinares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do jenipapeiro

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à família Rubiácea e é uma espécie nativa da América Tropical, sendo bastante encontrada na América Central, nas Antilhas e no México (DANTAS et al., 2009).

A espécie cujo fruto pode ser utilizado na alimentação de diversas formas é bastante utilizada na região Nordeste. Apesar da utilização frequente de seus frutos, a espécie ainda é explorada pela população nativa sob a forma extrativista (SILVA et al., 2010). Ela pode ser encontrada em quase todos os biomas, exceto nos pampas (SILVA et al., 2010). O fruto é muito apreciado pela população nordestina tornando-se promissora a sua comercialização em feiras livres, mercados atacadistas e supermercados. A industrialização, sob as mais diferentes formas de aproveitamento do fruto, tem estimulado bastante o crescimento da demanda no mercado, possibilitando a expansão do fruto para outras regiões brasileiras ou até mesmo para o mercado internacional (PRUDENTE, 2002).

Na região Nordeste do Brasil, principalmente no estado de Sergipe, o cultivo dessa espécie ocorre em pequenos pomares, dentro de pequenas propriedades agrícolas, em fragmentos de populações naturais nas áreas de Mata Atlântica, e em matas ciliares (SILVA et al., 2010). Dados recentes apontam uma área de 269,30 ha ocupada com a espécie nos estados da Bahia e Sergipe (CODEVASF, 2016).

A espécie apresenta uma rusticidade que a torna adaptável a várias condições edafoclimáticas, porém tem preferência por áreas com solos ligeiramente ácidos, com temperaturas médias entre 18 e 28 °C e precipitação anual entre 1200 e 4000 mm (PRUDENTE, 2002).

O jenipapeiro é uma árvore monóica e perene, podendo apresentar de 5 a 30 m de altura e 20 a 90 cm de diâmetro na idade adulta. Seu tronco é reto e cilíndrico, copa estreita e arredondada, possui folhas simples e flores hermafroditas. Os frutos são do tipo baga globosa (LORENZI, 2008), com várias sementes. O fruto apresenta de 6,5 a 8,5 cm de diâmetro, entre 200 a 400 g e odor ligeiramente fermentado quando maduros. Por ser carnoso e suculento pode ser consumido na forma *in natura* ou utilizado pela indústria alimentícia na fabricação de doces, sucos, licores, entre outros alimentos. As sementes são classificadas como intermediárias, por apresentarem certa tolerância à dessecação em função do método de secagem e, não suportarem longos períodos de armazenamento (MAGISTRALI et al., 2013). Estas suportam a dessecação entre 7% e 10% de teor de água e não toleram baixas temperaturas durante períodos prolongados (CARVALHO, 2006), podendo ser armazenadas por até 60 dias (FERREIRA et al., 2014). A propagação ocorre via sexuada ou assexuada (PRADO NETO et al., 2007).

Apresenta relevância socioeconômica, podendo ser cultivado para diversos fins, como madeireiro, alimentício e ambiental, pois possui potencial para recuperação de áreas degradadas, composição de áreas de preservação permanente e sistema agroflorestais (SÁ et al., 2015). Além de funcionar como fitoestabilizadora e rizofiltradora do cromo, um metal pesado, prejudicial aos organismos vivos (SANTANA et al., 2012).

A madeira é considerada de primeira qualidade por apresentar características de elasticidade e flexibilidade, excelente para a fabricação de laminados, móveis, cabo de ferramentas, escalas métricas, além de ser utilizada na construção civil e naval (CORDEIRO; FÉLIX, 2014).

Diversas partes da planta são indicadas como medicinais pela população. O caule tem efeito predominantemente purgativo, e quando cozido curam feridas escorbúicas, faringite granulosa e combate a anemia. A raiz também é considerada purgativa e, quando feita à decocção (fervura), é antigonorreica (CORRÊA, 1984). As folhas quando cozidas servem como antissifilítico e antidiarreico (ERBANO, 2010). Os frutos são ricos em ferro, vitaminas e carboidratos indicados no tratamento da anemia, doenças do baço e do fígado, além da asma

e diarreia, quando em infusão combate a enterite crônica (SÁ et al., 2015); e quando imaturos possuem potencial de utilização como corante natural, na indústria cosmética e têxtil (BTFP, 2005).

2.2 Conservação de recursos genéticos de jenipapeiro

A conservação dos recursos genéticos baseia-se em dois métodos, o *in situ*, quando a manutenção do material de interesse é feita em seu meio ou *habitat* natural, e o *ex situ*, quando a manutenção é feita fora do seu *habitat* natural (GASTAL; SARAGOUSSI, 2008). Elevadas perdas de variabilidade genética ocorrem devido à devastação dos ecossistemas em que a espécie ocorre, e isso tem causado preocupação entre os cientistas (SILVA et al., 2010), tornando cada vez mais difícil a conservação *in situ*.

A conservação *ex situ* pode ser realizada por meio do armazenamento de sementes (FAO, 1993). Todavia, o sucesso da conservação de sementes depende do conhecimento sobre o comportamento destas durante este processo, o que possibilita a utilização de condições adequadas para a manutenção da viabilidade (HONG; ELLIS, 1996). As sementes foram classificadas em dois grupos distintos com relação ao comportamento no armazenamento. No primeiro estão as sementes ortodoxas, que se mantêm viáveis após dessecação até um grau de umidade em torno de 5% e podem ser mantidas sob baixas temperaturas por um longo período. No segundo grupo têm-se as recalcitrantes, ou sementes sensíveis à dessecação, que não sobrevivem com baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento por longo prazo (ROBERTS, 1973; CARVALHO, 2006). Além destes grupos há um terceiro, no qual as sementes apresentam um comportamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante (ELLIS et al., 1990). Esse grupo é composto por espécies cujas sementes não toleram a dessecação em níveis extremamente reduzidos, suportando a dessecação entre 7% e 10% de teor de água, podendo ser armazenadas por até dois meses sem comprometer o vigor e a viabilidade (FERREIRA et al., 2011).

O jenipapeiro é uma espécie perene cuja conservação de seus recursos genéticos é, sobretudo, baseada em coleções de campo devido à fisiologia de suas sementes. Por serem intermediárias não toleram a dessecação a níveis extremamente reduzidos (OLIVEIRA et al., 2011; CARVALHO, 2006). Segundo relatos de Vieira (2013) as sementes possuem período de viabilidade relativamente curto, com ausência de germinação após 60 dias de armazenamento.

A manutenção das espécies fora de seu *habitat* natural tem como principais características: preservar alelos por séculos; permitir que em apenas um local seja reunido material genético de muitas procedências, facilitando o trabalho do melhoramento genético; garantir melhor proteção à diversidade intraespecífica, especialmente de espécies de ampla distribuição geográfica. Este método implica, entretanto, na paralisação dos processos evolutivos, além de depender de ações permanentes do homem, visto concentrar grandes quantidades de material genético em um mesmo local, o que torna a coleção bastante vulnerável (MAPA, 2017).

Nesse sentido, a fim de conservar os recursos genéticos do jenipapeiro, em Sergipe a Embrapa Tabuleiros Costeiros junto à plataforma de recursos genéticos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária vem intensificando ações de coleta, caracterização e conservação de germoplasma de jenipapeiro. Em 2009, o banco ativo de germoplasma de jenipapeiro (BAG Jenipapo) foi implantado no campo experimental de Nossa Senhora das Dores - SE. Atualmente, o BAG Jenipapo conta com 24 acessos nominados de acordo com a localidade na qual foram coletados, e são representados por 227 plantas. São 220 da espécie *Genipa americana* L. e sete de *Genipa infundibuliformis* Zappir & Semir (MUNIZ, 2017). Existem mais três bancos de germoplasma localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal, SP; Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, em Cruz das Almas, BA e Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola

S.A., em Conceição do Almeida, BA (CARVALHO, 1999; DONADIO, 1999; LUNA, 1999 apud DANTAS et al., 2009).

2.3 Aplicação da cultura de tecidos de plantas na conservação em longo prazo de recursos genéticos

Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* para conservação em bancos de germoplasma foram amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de mil espécies, muitas das quais oriundas de regiões tropicais. Para as espécies ameaçadas de extinção e cuja conservação por sementes não é possível, este é um método considerado altamente promissor (HOYT, 1992). Assim, as técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em métodos valiosos para a conservação de recursos genéticos vegetais (HARDING et al., 1997). Em alguns casos, a conservação *in vitro* pode ser a única estratégia para conservar certas espécies, como no caso de plantas com sementes de período de viabilidade curto e de difícil propagação vegetativa por métodos convencionais (ROCA et al., 1991; FERREIRA et al., 1998).

Cada método de conservação possui vantagens e desvantagens, sendo necessárias estratégias complementares para uma conservação máxima da diversidade genética, variando de acordo com cada espécie (MARTIN; PRADEEP, 2003).

Nesse sentido, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas, como estratégia complementar à conservação da variabilidade genética existente e para acelerar a multiplicação de genótipos promissores torna-se imprescindível (PILATTI et al., 2011) especialmente para espécies que não podem ter suas sementes conservadas a baixa temperatura e umidade, como as do jenipapeiro (SÁ et al., 2015).

A criopreservação compreende a conservação do material vegetal em temperatura ultrabaixa fornecida pelo nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor ao redor de -150°C (BERJAK et al., 2011). Desta forma, a criopreservação torna-se um procedimento viável para conservação de material biológico por longos períodos de tempo, requerendo espaço reduzido e pouca manutenção (BENSON, 2008; SARTOR, 2012).

Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre alguma delas é dependente da espécie e do explante a ser criopreservado (PANIS; LAMBARDI, 2005). Uma das técnicas de criopreservação desenvolvida recentemente é a *droplet vitrification*, que consiste no pré-tratamento dos explantes com solução de vitrificação antes que sejam dispostos em tiras de papel alumínio com uma gota de *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) e então imersos em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). Outra técnica é o encapsulamento-dessecação, onde os encapsulados contendo o explante são submetidos à dessecação em fluxo laminar ou sílica gel e, então, são imersos em nitrogênio líquido. Estes procedimentos permitem taxas de resfriamento ultrarrápidas, diminuindo a formação de cristais de gelo, prejudiciais às células (FULLER, 2004).

A maioria das células vivas vegetais possui grande quantidade de água, e um dos grandes problemas da criopreservação é a formação de gelo devido ao congelamento da água intracelular. Os cristais de gelo causam a ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi permeabilidade e da compartimentalização da célula, ocasionando, conseqüentemente, a morte celular (SANTOS, 2000). Extensiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado; assim, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo (SANTOS, 2001; SANTOS; SALOMÃO, 2010).

Apesar de não existir um procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para outras espécies que exijam menos manipulação (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

No Brasil, a criopreservação tem sido utilizada na conservação de recursos genéticos de muitas espécies, incluindo àquelas ameaçadas de extinção e às que apresentam comportamento recalcitrante ou intermediário. Vários estudos já foram aplicados em espécies

florestais e frutíferas como abacaxizeiro (SOUZA et al., 2016), maracujazeiro (MERTHY et al., 2014), mangabeira (NOGUEIRA, 2010; SARTOR, 2012; PRUDENTE et al., 2017; SANTOS et al., 2015) e jenipapeiro (SANTOS; SALOMÃO, 2016). Santos et al. (2015) relataram a eficiência das técnicas de vitrificação em gotas e vitrificação com mais de 70% de regeneração de ápices caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa*) na fase de exposição ao PVS2 e após a criopreservação. Souza et al. (2016) também reforçam a eficiência da técnica de vitrificação em gotas com diferentes genótipos de abacaxi (*Ananas comosus*), expostos ao PVS2 em diferentes tempos (30; 45; 60 e 90 minutos) com média e altas taxas de regeneração (100; 100; 93 e 40%, respectivamente). A estratégia de criopreservação para recursos genéticos de jenipapeiro é adequada por permitir a conservação em longo prazo.

Existem poucos estudos publicados com jenipapeiro em condições de conservação em longo prazo. Sá et al. (2015) observaram altas taxas de regeneração de ápices caulinares encapsulados, imersos em soluções crioprotetora (0,5M de sacarose) e desidratados em câmara de fluxo laminar por 0, 2 e 4 horas atingindo 91; 67; 100 e 91,67% de regeneração. Entretanto, a regeneração não foi observada após a criopreservação. Estudos realizados por Santos e Salomão (2016) observaram alta porcentagem de regeneração de eixos embrionários de jenipapeiro criopreservados (93; 96 e 93%, em sementes com 13,26; 9,57 e 6,79% de umidade, respectivamente).

2.4 Sementes sintéticas

Muitas espécies tropicais e subtropicais possuem características que dificultam a sua conservação por métodos tradicionais, em sua grande maioria representada pelas plantas frutíferas. Muitas dessas espécies produzem sementes consideradas recalcitrantes ou intermediárias, as quais são sensíveis ou apresentam uma determinada tolerância à dessecação em função do método de secagem. Dessa forma não suportam longos períodos de armazenamento (MAGISTRALI et al., 2013), podendo ser conservadas apenas por semanas a poucos meses (RAI et al., 2009).

A tecnologia de encapsulamento ou sementes sintéticas, desenvolvida por Kitto e Janick (1982) foi baseada no uso de embriões somáticos, como sementes funcionais que consiste no envolvimento do material vegetal como ápices caulinares ou gemas laterais em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio (BENELLI et al., 2013). A semente sintética quando semeada sobre condições *in vitro* e *ex vitro* possui a capacidade de se regenerar e formar uma nova planta, mantendo esse potencial mesmo após o armazenamento (ARA et al., 2000).

A matriz de alginato de sódio que envolve os propágulos tem como principais vantagens a proteção dos embriões somáticos, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas (GUERRA et al., 2001). Esta técnica tem sido continuamente aprimorada de tal maneira que vários elementos podem ser incorporados à matriz de encapsulamento, entre eles, fitorreguladores, macro e micronutrientes, carboidratos e vitaminas (GUERRA et al., 2001).

A utilização desta técnica abre novos horizontes na agricultura moderna apresentando-se como uma poderosa e promissora ferramenta utilizada na propagação e conservação de plantas transgênicas, plantas não produtoras de sementes e plantas com problemas de propagação e conservação via sementes naturais. A utilização de sementes sintéticas traz avanços significativos na área da biotecnologia, possibilitando uma redução considerável na duração e no custo de procedimentos de melhoramento convencional de plantas e na produção de clones (MONDO; CICERO, 2008). Estudos realizados por Nogueira (2010) mostraram a eficiência da tecnologia de encapsulamento aplicada à mangabeira, espécie frutífera nativa. Os encapsulados com ápices caulinares alcançaram elevada taxa de sobrevivência (74%) em meio de regeneração MS acrescido de 8,87 μM de BAP após 30 dias e 70% de regeneração aos 45 dias. Resultados semelhantes foram observados por Prudente et al. (2017) onde gemas laterais de mangabeira encapsuladas cultivadas em meio de regeneração WPM suplementado com 0,2 μM BAP atingiram 86% de sobrevivência aos 30 dias de cultivo.

A crioconservação é uma tecnologia de baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, apresenta baixo risco de variações somaclonal e facilidade de manuseio, além de permitir o intercâmbio de germoplasma (RAI et al., 2009).

Não existem informações publicadas sobre a aplicação da técnica de sementes sintéticas para o jenipapeiro e nem estudos sobre a nutrição da matriz de alginato.

O hidrogel alginato de sódio é considerado um dos principais géis utilizados para a realização da técnica de encapsulamento, devido às suas propriedades gelificantes, fácil acesso, baixo custo, facilidade de manuseio e ausência de toxicidade. A resistência e dureza das cápsulas são influenciadas pelo tempo de complexação a qual são expostas (REDENBAUGH et al., 1988). Tal resistência ou dureza pode acarretar, em alguns casos, a uma menor taxa de ruptura das cápsulas pelos explantes encapsulados (MONDO; CICERO, 2008) sendo necessária a adição de etapas que facilitem o rompimento, como a descomplexação utilizando o nitrato de potássio (KNO_3), que possibilita o enfraquecimento facilitando a conversão em plântula (ONISHI et al., 1994). Esse aspecto é um dos mais importantes da tecnologia de sementes sintética, sendo também fator limitante na prática dessa ferramenta (ADRIANI et al., 2000).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANI, M.; PICCIONI, E.; STANDARD, A. Effect of different treatments on the conversion of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds. **Newzealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 28, p. 59-67, 2000.

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Semente sintética: perspectivas e limitações. **Current Science**, Bangalore, v. 78, p. 1438-1444, 2000.

BENELLI, C.; CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 31, p.171-185, 2013.

BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E. E.; HARDING, K.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, S. J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 47, p. 65-81, 2011.

BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation-A Practical Guide**. New York: Springer, 2008. p. 15-32.

BTFP - BIOTRADE FACILITATION PROGRAMME. **Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species - *Genipa americana* Jagua**, huito. United Nations Conference on Trade and Development, p.38, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Taxonomia e nomenclatura do jenipapeiro**. Embrapa. Colombo, 2006. Circular Técnica, 80.

CODEVASF. Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba. **Agricultura irrigada: fruticultura**. Disponível em: <<http://www.codevasf.br/produtos/fruticultura>>. Acesso em: 2 maio. 2016.

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**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p.747.

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. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 275-291.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, H. An intermediate category of seed storage behaviour I. Coffee. **Journal of Experimental of Botany**, London, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 5-16, 2011.

ERBANO, M. **Morfoanatomia de folha e caule das espécies *Centrolobium tomentosum* Guillemin ex Benth. (Fabaceae), *Genipa americana* L. e *Randia armata* (Sw.) DC. (Rubiaceae)**. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Paraná-RS, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 Ago. 2017.

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

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1998.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

FAO. **Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species**. Rome: FAO, p. 83, 1993. (FAO Forestry Paper, 113)

GASTAL, M. L.; SARAGOSSI, M. Os instrumentos para a conservação da biodiversidade. **Seria melhor mandar ladrilhar**, Brasília, p. 43-62, 2008.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DU CROQUET, P. H. J.; NODARI, R.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p.117-128, 2001.

HARDING, K.; BENSON, E. E.; CLACHER, K. **Plant conservation biotechnology: an overview**. Agro-Food-Industry Hi-Tech, 1997.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres de plantas cultivadas**. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 1992. p. 52.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55p. (Technical Bulletin, 1).

KITTO, S. K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488, 1982.

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

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**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.

MARTIN, K. P.; PRADEEP, A. K. Simple strategy for the in vitro conservation of *Ipsea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 74, p. 197-200, 2003.

MAPA - Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>. Acesso em: 7 Maio. 2017.

MERTHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants. **Cryoletters**, London, v. 35, n. 3, p. 204-215, 2014.

MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Aspectos sobre a tecnologia de sementes sintéticas. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 18, n. 1,2,3, p. 23-29, 2008.

MUNIZ, A. V. C. S. **Banco ativo de germoplasma do jenipapo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2017. Folder.

NOGUEIRA, G. F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas in vitro de mangabeira**. 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2010.

OLIVEIRA, L. M.; SILVA, E. O.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, E. U. Períodos e ambientes de secagem na qualidade de sementes de *Genipa americana* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 495-502, 2011.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 137-145, 1994.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. In: Eletronic forum on biotechnology in food and agriculture, 13., 2005, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2005.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, Berlin, v. 47, p. 82-98, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-010-9302-y>>. Acesso em: 2 out. 2016.

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.(ed). **Fruteiras potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas**. Aracaju: Embrapa-CPATC/Emdagro, 2002. p. 88-114.

PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R.; NERYF, C.; REIS, M. V.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, L. C. Encapsulation of lateral buds of *Hancornia speciosa*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1155, p. 59-64, 2017.

- RAI, M. K.; ASTHANA, P.; SINGH, S. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants—a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, 2009.
- REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Encapsulated plant embryos. In: MIZRAHI, A. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture**. New York: Alan R. Liss, 1988. p. 226-348.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 4, p. 499-514, 1973.
- ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.
- SÁ, F. P.; SOUZA, V. F. D.; SILVA, V. C.; LÉDO, S. A. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.
- 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**, Amsterdam, v. 80, p. 35-42, 2012.
- 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**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 751-763, 2015.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p.70-84, 2000.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using in vitro culture. **International Journal of Agronomy**, London, v. 2016, p. 1-6, 2016.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: criopreservação**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16p. 2010.
- SANTOS, P. A. A.; PAIVA, R.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. C.; SANTANA, M. C.; SILVA, D. P. C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for longterm storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringa, v. 37, p. 289-296, 2015.
- SANTOS, R. O. S. **Caracterização de jenipapeiros (*Genipa americana* L.) em Cruz das Almas-BA**. 2001. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2001.
- SARTOR, F. R.; MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

SILVA, D. B.; SALOMÃO, A. N.; CARVALHO, P. C. L.; WETZEL, M. M. V. S.; SILVA, D. B. Jenipapo. In: VIEIRA R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B. DA; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (ed.). **Frutas nativas da região Centro Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 199-220, 2010.

SOUZA, F. V.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. C. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

VIEIRA, L. J. **Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de Manihot**. 2013. 103 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2013.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, v. 1, p. 297-330, 1998.

4. ARTIGO 1

TEMPOS DE DESSECAÇÃO NA UMIDADE DE SEMENTES E REGENERAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE JENIPAPEIRO CRIOPRESERVADOS

Periódico submetido (ou a ser submetido): Scientia Horticulture

RESUMO

O jenipapeiro, espécie frutífera de alto potencial econômico na região Nordeste, devido à fisiologia de suas sementes, tem sido conservado apenas em campo colocando em risco o valor desse recurso genético. Estratégias complementares como a criopreservação têm sido aplicadas com sucesso em outras espécies com sementes intermediárias e recalcitrantes. O teor de água intracelular é fator limitante para a sobrevivência do explante criopreservado e a tolerância à desidratação pode variar de espécie para espécie. O teor de água apropriado deve ser atingido para garantir adequada sobrevivência. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tempos de desidratação em sílica gel na umidade de sementes e capacidade regenerativa de eixos embrionários de *Genipa americana* L. para o estabelecimento de futuros protocolos de criopreservação. Foram utilizados como fonte de explantes sementes de frutos maduros dos acessos Núcleo Bandeirante, DF e Umbaúba, SE. As sementes foram submetidas à dessecação em boxes Magenta™ contendo sílica gel (50 g/magenta) por 0, 12, 16 e 20 horas em temperatura ambiente. A umidade das sementes (5 amostras de 10 sementes/genótipo) foi determinada para cada período de dessecação. Após cada período de dessecação as sementes foram inoculadas no meio de germinação (controle 2) e duas amostras de 10 sementes para cada tempo foram imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Para avaliação da porcentagem da germinação, os criotubos foram descongelados em banho-maria a 40 ± 2 °C por 3 minutos e as sementes imersas em água estéril por 24 horas, após esse período foram excisados os eixos embrionários e imediatamente inoculados em meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,35% de Phytigel® e avaliadas aos 60 dias. Altas taxas de sobrevivência foram observadas para o acesso Umbaúba (95; 100 e 95%) e Núcleo Bandeirante (85; 90 e 80%), respectivamente, nos tempos de dessecação de 12, 16 e 20 horas.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., conservação, criopreservação, recursos genéticos.

ABSTRACT

Effect of dehydration periods on seed moisture and regeneration of embryonic axes of cryopreserved *Genipa americana* L trees

Journal of submission (or to be submitted): Scientia Horticulture

ABSTRACT

The fruit tree *Genipa americana* L is a species of high economic potential in the northeastern region of Brazil, but due to the seed physiology, has been preserved only in the field, making this valuable genetic resource vulnerable. Complementary strategies such as cryopreservation have been successfully applied to other species with intermediate and recalcitrant seeds. The intracellular water content is a limiting factor for the survival of the cryopreserved explant and dehydration tolerance can vary among species and genotypes of the same species. Adequate water content must be ensured to maximize survival. The purpose of this study was to evaluate the effect of different dehydration periods in silica gel on the seed moisture content and regenerative capacity of embryonic axes of *Genipa americana* L. for the establishment of cryopreservation protocols for future applications. Seeds of mature fruits of the accessions Núcleo Bandeirante, DF and Umbaúba, SE, were used as explant sources. The seeds were dehydrated in Magenta™ boxes containing silica gel (50 g/box) for 0, 12, 16, and 20 h at ambient temperature. The seed moisture content (5 samples of 10 seeds per genotype) was determined after each desiccation period. The dehydrated seeds were inoculated on germination medium (control 2) and two samples of 10 seeds per period were immediately placed in cryotubes and immersed in liquid nitrogen (-196°C). To assess the germination percentage, the cryotubes were thawed in a water bath at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 min and the seeds soaked in sterile water for 24 h. After this period, the embryonic axes were excised and immediately inoculated in MS culture medium with 3% sucrose and 0.35% Phytigel® and evaluated for 60 days. High survival rates were observed for accession Umbaúba (95; 100 and 95%) and Núcleo Bandeirante (85; 90 and 80%, respectively, after desiccation periods of 12, 16 and 20 h.

Key-words: *Genipa americana* L., conservation, cryopreservation, genetic resources.

4.1 Introdução

A *Genipa americana* L., espécie nativa pertencente à família das *Rubiaceae*, é encontrada no norte da América do Sul e Central. A árvore do jenipapeiro, como é conhecida popularmente, apresenta potencial de uso socioeconômico e é utilizada para diversos fins, entre eles, a indústria alimentícia e têxtil, madeireira e medicinal. Por apresentar resistência a solos encharcados, desperta grande interesse para recuperação de áreas degradadas, áreas de preservação permanente e entre outros (DANTAS et al., 2009; OLIVEIRA, et al., 2014; SÁ et al., 2015).

A espécie apresenta fruto muito apreciado na região Nordeste e, apesar da grande demanda na região, ainda é explorada de forma extrativista (SILVA et al., 2009). A conservação de seus recursos genéticos é, sobretudo, baseada em coleções de campo, devido à fisiologia de suas sementes, que apresentam comportamento intermediário no armazenamento, não tolerando dessecação em níveis extremamente reduzidos (CARVALHO; NASCIMENTO, 2000; OLIVEIRA et al., 2011). Visando assegurar a sustentabilidade ecológica e econômica da espécie, diversas instituições de pesquisa têm conservado sua diversidade genética em campo (SILVA JÚNIOR et al., 2012).

O avanço das técnicas biotecnológicas apresenta-se como estratégia complementar à conservação à técnica de criopreservação. A criopreservação consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultrabaixas, utilizando nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor ao redor de -150°C por longos períodos (BERJAK et al., 2011). É um procedimento viável para conservação de material biológico por longos períodos de tempo, requerendo espaço reduzido e pouca manutenção (BENSON, 2008; SARTOR et al., 2012).

Há diferentes métodos de criopreservação, destacando-se a desidratação, encapsulamento-desidratação, droplet-vitrificação e vitrificação (KAVIANI, 2011). Essa técnica tem sido empregada com sucesso para diferentes explantes em *Citrus* sp. (KAYA et al., 2017); *Coffea arabica* L. (FIGUEIREDO et al., 2017), *Hancornia speciosa* (PRUDENTE et al., 2014; SANTOS et al., 2015), *Genipa americana* (SÁ et al., 2015; SANTOS; SALOMÃO, 2016), *Pistacia vera* (BENMAHIOUL et al., 2015) e *Ananas comosus* (SOUZA et al., 2016). Diferentes explantes podem ser criopreservados como eixos embrionários, meristemas apicais e calos (SANTOS et al., 2015).

O teor de água intracelular é fator limitante para a sobrevivência do explante criopreservado, dessa forma a desidratação é essencial, podendo ser física por meio da evaporação, promovida pela exposição do material à sílica gel ou câmara de fluxo laminar ou pelo uso de crioprotetores que provocam a desidratação osmótica do material (LOPES, 2005; SÁ et al., 2015). A redução da água de explantes a níveis extremamente baixos capazes de evitar a formação de cristais de gelo, é o passo mais crítico na obtenção de um protocolo bem-sucedido de criopreservação (LOPES et al., 2013).

Muitos são os danos causados às amostras congeladas com teor de água inadequado, tais como: desorganização mecânica das estruturas vegetais, danos mecânicos resultantes da redução do volume celular e injúrias na membrana celular (SANTOS; SALOMÃO, 2016). A tolerância à desidratação varia de espécie para espécie e entre tecidos de uma mesma planta e a umidade apropriada deve ser atingida para garantir adequada sobrevivência do material (ROCHA, 2010).

A conservação *ex situ* de sementes em criobancos demanda estudos prévios de procedimentos de desidratação para o ajuste da umidade adequada que viabilize a conservação em longo prazo. Diversos métodos clássicos de avaliação da viabilidade de sementes têm sido aplicados, entretanto a cultura *in vitro* de embriões ou eixos embrionários permite também a avaliação da integridade fisiológica da criopreservação (SANTOS; SALOMÃO et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes tempos de desidratação em sílica gel na capacidade regenerativa de eixos embrionários criopreservados de acessos de *Genipa americana* L.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes sementes de frutos maduros de *Genipa americana* L., coletados de plantas de populações naturais dos acessos Núcleo Bandeirante, Distrito Federal (15°51'55,72"S; 47°57'34,59"O) e Umbaúba, Sergipe (11°21'56,1"S; 37°41'32,8"O). As sementes foram extraídas manualmente e lavadas com detergente até a retirada total da polpa e imersas em álcool 70% por 3 minutos e em solução de hipoclorito de sódio 2-2,5% por 15 minutos, e depois enxaguadas três vezes e secas em papel *germitest* por 24 horas em temperatura ambiente.

4.2.2 Efeito do tempo de dessecação na umidade e viabilidade de sementes de acessos de jenipapeiro

Para obtenção da porcentagem inicial de germinação das sementes (controle 1), as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% de sacarose e 0,35% de Phytigel® (meio de germinação).

Para os estudos do efeito da dessecação na germinação de eixos embrionários as sementes foram submetidas à dessecação em frascos de policarbonato Magenta™ (77 mm × 77 mm × 97 mm) contendo 50 g de sílica gel/frasco por 0, 12, 16 e 20 horas em temperatura ambiente.

Para cada período de dessecação duas amostras de 10 sementes cada foram inoculadas no meio de germinação (controle 2) e duas amostras de 10 sementes cada foram imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196°C).

Para determinação da umidade inicial das sementes e após cada período de dessecação, cinco repetições de 5 sementes foram pesadas para obtenção da massa fresca (MF) e transferidas para estufa por 72 horas em temperatura de 105 ± 3 °C para obtenção da massa seca (MS). O teor de água, em base úmida (%bu) foi determinado pela expressão:

$$\text{Teor de água (\% bu)} = \frac{\text{Massa fresca} - \text{Massa seca}}{\text{Massa fresca}} * 100$$

A porcentagem germinação, comprimento da parte aérea e da raiz e número de folhas foram avaliados aos 60 dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (dois acessos e quatro tempos de dessecação), com cinco repetições.

4.2.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados

Para obtenção da porcentagem de germinação inicial (controle 1) as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS descrito no item 4.2.2.

Para os estudos do efeito da dessecação na germinação, as sementes foram submetidas à dessecação em boxes Magenta™ (77 mm × 77 mm × 97 mm) contendo 50 g de sílica gel cada por 0, 12, 16 e 20 horas em temperatura ambiente.

Após cada período de dessecação duas amostras de 10 sementes foram inoculadas no meio de germinação (controle 2) e duas amostras de 10 sementes cada foram imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196°C).

Para avaliação da porcentagem da germinação dos eixos embrionários, após a criopreservação, os criotubos foram descongelados em banho-maria a 40 ± 2 °C por 3

minutos e as sementes imersas em água estéril por 24 horas, conforme metodologia de Santos e Salomão (2016). Após esse período foram excisados os eixos embrionários e imediatamente inoculados em meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,35% de Phytigel[®].

A porcentagem regeneração, o comprimento da parte aérea e da raiz e o número de folhas foram avaliados aos 60 dias da inoculação.

Foi considerado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (dois acessos e quatro tempos de dessecação) com cinco repetições.

4.2.4 Análises histológicas

As análises foram realizadas nos laboratórios de Anatomia Vegetal e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutura da Universidade Federal de Lavras. Eixos embrionários foram excisados das sementes e fixados em formaldeído FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) (CASTRO et al., 2009). Em seguida, as amostras foram submetidas a um gradiente de álcool 70%, 80%, 90% e 100% em intervalos de 2 horas cada, para desidratação. Posteriormente, as amostras foram infiltradas por etanol PA 100% + resina líquida (1:1) por 2 horas. Resina ativada = solução de infiltração (resina + pó ativador, na proporção indicada pelo fabricante) por 24 horas na geladeira. Logo após, foi preparada a solução de inclusão, juntando o endurecedor à resina de infiltração ou resina ativada (segundo as proporções indicadas pelo fabricante).

Os fragmentos vegetais foram infiltrados em histomoldes 6 mm x 8 mm da Leica[®] (formas plásticas, próprias para inclusão). No momento da inclusão os fragmentos foram posicionados adequadamente e polimerizados em estufa a 37°C. Os blocos foram mantidos com baixa umidade, armazenados em recipientes com boa vedação e conteúdo sílica gel. Incluído o material, foi realizada a microtomia utilizando o micrótomo rotativo semiautomático que foi padronizando a uma espessura de cortes variando de 5 a 8 µm. Em seguida, foram estendidos sobre a lâmina contendo pequena quantidade de água. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas com cortes distendidos foram coradas utilizando o corante Azul de Toluidina preparado em tampão acetato (pH 4,7). Após 3 minutos, foram lavadas em água acética até a retirada do excesso do corante. As lâminas após a secagem foram fixadas com Etterlan[®], e, posteriormente, observadas em microscópio Nikon Eclipse E100 acoplado à câmera Infinity 1, onde foram fotomicrografadas.

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Para cada tratamento, eixos embrionários foram fixados em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por um período de 24 horas. Posteriormente foram transferidos cinco fragmentos para uma solução-tampão de cacodilato (0,05 M) e lavados por três vezes durante 10 minutos. Em seguida, foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados em água destilada por três vezes e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Posteriormente, os espécimes foram levados à secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido em aparelho Balzers CPD 030; em seguida, montados em suportes de alumínio (stubs) e cobertos com ouro (evaporador Balzers SCD 050) para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. Diversas imagens das amostras foram registradas digitalmente, em aumentos variáveis, e gravadas no *Software Photopaint* do pacote Corel Draw 9 (ALVES, 2004).

4.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância para estudos de efeitos qualitativos e estimadas equações de regressão para os efeitos quantitativos, utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA et al., 2014).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de acessos de jenipapeiro

Houve efeito significativo da interação acesso x tempo de dessecação na umidade das sementes (Anexo 1A). O acesso Núcleo Bandeirante apresentou um comportamento linear ($y = -0,2841x + 14,957$; $R^2 = 0,8553$, Figura 1). No tempo T0 a umidade foi de 15,48%, com a exposição à sílica gel em diferentes períodos houve a redução do teor de água com umidade mínima de 9,86% em 20 horas. Para o acesso Umbaúba a umidade das sementes apresentou um comportamento quadrático ($y = 0,0385x^2 - 1,718x + 28,391$; $R^2 = 0,9925$, Figura 1). No tempo T0 a umidade foi de 28,46%, com a redução do teor de água a umidade mínima atingida foi de 9,0% em 20 horas de exposição à sílica gel.

Apesar das umidades iniciais dos dois acessos serem diferentes, a dessecação em sílica gel por 20 horas reduziu a valores próximos (9,86 e 10%). A umidade inicial de 43,89% em sementes de *Genipa americana* oriundas do Cerrado reduziu gradativamente atingindo o mínimo de 6,79% em 36 horas, em diferentes tempos de dessecação em sílica gel (SANTOS; SALOMÃO, 2016). A sílica gel proporciona secagem rápida em ambiente asséptico (PÉREZ-GARCIA et al., 2007) por meio da adsorção da água nos poros de sua superfície (FIORE, 2013).

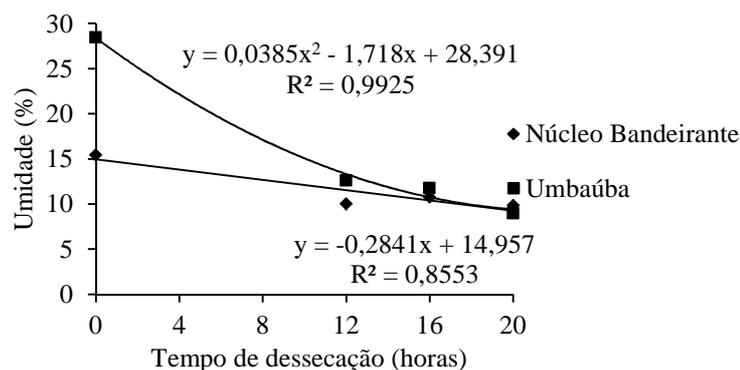


FIGURA 1. Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de acessos de jenipapeiro.

4.3.2 Efeito do tempo de dessecação na germinação e crescimento de acessos de jenipapeiro não criopreservados

Houve efeito significativo da interação acessos e tempo de dessecação de sementes na porcentagem de germinação (Anexo 2A). O acesso Umbaúba obteve 100% de germinação em todos os tempos de dessecação (Tabela 1). Entretanto, o acesso Núcleo Bandeirante não diferiu do acesso Umbaúba no tempo 0 (sem dessecação), sendo que a partir de 12 horas de dessecação obteve menor germinação, com redução drástica desses valores. Segundo Carvalho e Nascimento (2000) o jenipapeiro tem a classificação de sementes intermediárias não podendo sofrer dessecação drástica tolerando aproximadamente 10% de umidade. A variação no comportamento entre acessos provavelmente se deva ao fato de que o acesso Núcleo Bandeirante apresente uma maior sensibilidade à dessecação. Segundo Bewley e Black (1994) os mecanismos de tolerância à dessecação de sementes são adquiridos após a histodiferenciação e são iniciados por tecidos maternos e não por sinais ambientais.

A germinação das sementes do acesso Núcleo Bandeirante apresentou um comportamento linear decrescente ($y = -2,8571x + 81,786$; $R^2 = 0,6836$, Figura 2). No tempo T0 a germinação foi de 80%, com a exposição à sílica gel em diferentes tempos, houve a redução para 10% em 20 horas de dessecação.

TABELA 1. Porcentagem de germinação de acessos de jenipapeiro em diferentes tempos de dessecação.

Acessos	Tempos de dessecação (horas)			
	0	12	16	20
Núcleo Bandeirante	80a	40b	60b	10b
Umbaúba	100a	100a	100a	100a

CV (%) 24,37

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

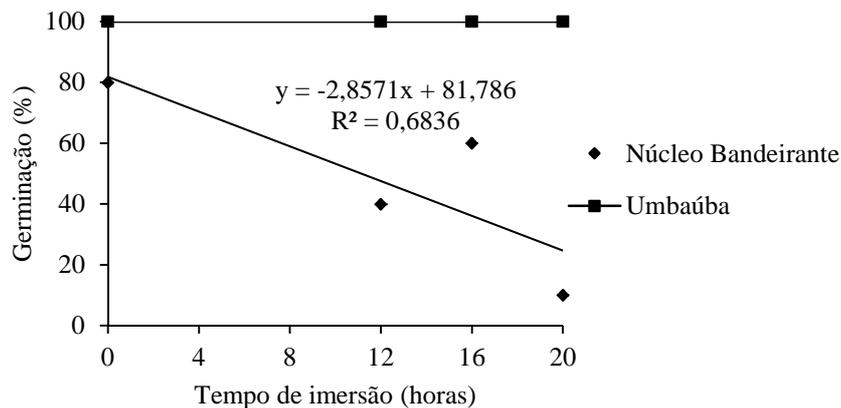


FIGURA 2. Efeito do tempo de dessecação na germinação de acessos de jenipapeiro.

As sementes de jenipapeiro recém-colhidas e postas para germinar apresentam altas percentagens de germinação (OLIVEIRA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012) perdendo sua viabilidade à medida que são desseçadas. A perda de água associada à velocidade com a qual a mesma é removida pode influenciar a viabilidade de sementes de *Genipa americana* (MAGISTRALI et al., 2013), podendo impedir os processos ligados à recuperação sendo necessário um maior tempo para os reparos na reidratação (OLIVER; BEWLEY, 1997).

Estudando a capacidade de tolerância à dessecação de sementes de *Genipa americana* submetidas a diferentes procedimentos de secagem rápida, Carvalho e Nascimento (2000) obtiveram uma germinação de 96% em sementes frescas (39,8% de umidade) e valores superiores a 50% com redução da umidade após 24 horas (10,3% de umidade). Entretanto, em contínua exposição até 72 horas, as sementes apresentaram umidade de 6,2% e perda total da viabilidade. Taxas de germinação de 98%; 91%; 87%; 68%; 35% e 10% e umidade de 46,9%; 30,5%; 20,8%; 15,6%; 10,2% e 5,4%, respectivamente, foram observadas por Magistrali et al. (2013) ao estudarem o efeito da taxa de secagem na tolerância a dessecação e o armazenamento de sementes de *Genipa americana*.

Quanto às variáveis de crescimento, no acesso Umbaúba houve efeito significativo do tempo de dessecação para o comprimento da parte aérea e número de folhas. Não houve efeito para o comprimento da raiz aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Anexo 3A). O comprimento da parte aérea e o número de folhas apresentaram comportamento linear decrescente representada pela equação ($y = -0,1357x + 4,3436$; $R^2 = 0,9452$) e ($y = -0,1x + 1,95$; $R^2 = 0,9868$), respectivamente (Figuras 3A e B).

Para o comprimento da parte aérea, o tempo T0 (controle) foi superior, com média 4,28 cm e redução linear nos diferentes tempos de dessecação chegando ao valor mínimo de 1,34 cm em 20 horas. Para o número de folhas, o mesmo comportamento foi observado na ausência de dessecação (T0) com média de 2,0 folhas.

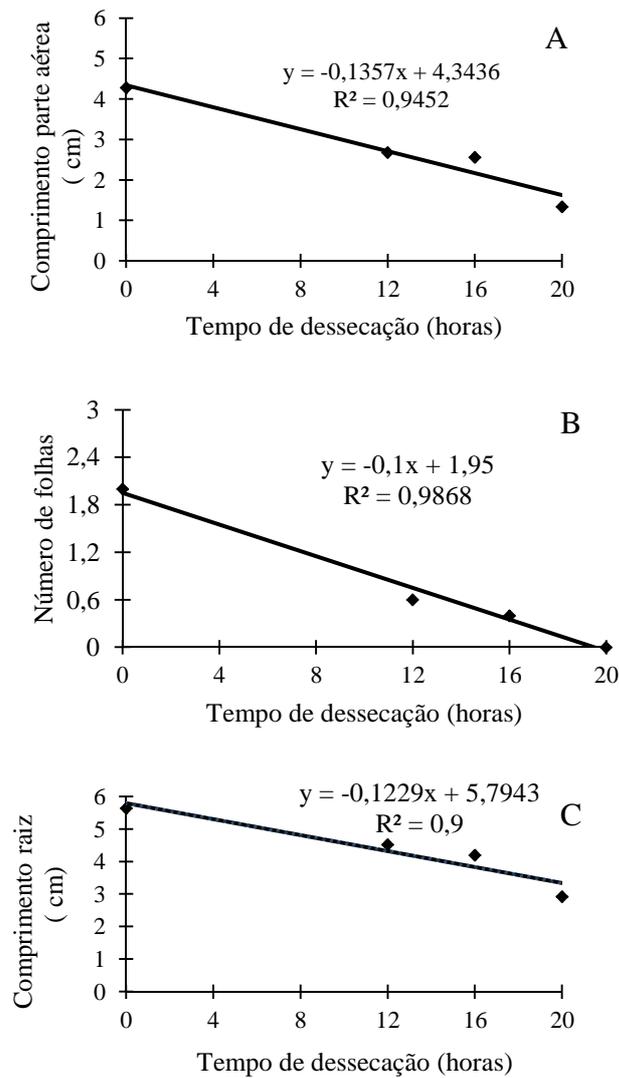


FIGURA 3. Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento plântulas do acesso Umbaúba aos 60 dias de cultivo *in vitro*. A- comprimento da parte aérea; B- número de folhas e C- comprimento da raiz.

Com relação ao comprimento da raiz, a exposição à sílica gel influenciou negativamente a velocidade da protrusão da radícula. O comprimento da raiz apresentou comportamento linear decrescente representada pela equação ($y = -0,1229x + 5,7943$, $R^2 = 0,9$). No tempo T0 apresentou média de 5,64 cm, atingindo valor mínimo de 2,92 cm em 20 horas (Figura 3C). Para o acesso Núcleo Bandeirante não houve efeito significativo do tempo de dessecação no comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e número de folhas aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 2). Devido a maior sensibilidade do acesso à redução da umidade, as plântulas em comparação com o acesso Umbaúba apresentaram resultados inferiores de desenvolvimento, provavelmente, por possuírem mecanismos intrínsecos de tolerância à baixa umidade.

TABELA 2. Efeito do tempo de dessecação de sementes do acesso Núcleo Bandeirante no comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRAIZ) e número de folhas (NF) de plântulas aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tempo dessecação (h)	CPA (cm)	CRAIZ (cm)	NF
0	4,36a	4,00a	2,00a
12	4,25a	3,62a	1,75a
16	3,80a	3,34a	1,40a
CV (%)	8,05	8,03	10,14

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.3.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados

Para o acesso Umbaúba a porcentagem de regeneração no tratamento T16 (16 horas de dessecação) foi maior que T0 (controle), mas não diferiu estatisticamente dos demais. Em relação aos acessos em estudo não houve efeito significativo do tempo de dessecação na porcentagem de regeneração dos eixos embrionários criopreservados aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 3).

TABELA 3. Porcentagem de regeneração de eixos embrionários de acessos de jenipapeiro criopreservados aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tempo de dessecação (horas)	Umbaúba	Núcleo Bandeirante
0	90a	100a
12	95a	85 ^a
16	100a	90 ^a
20	95a	80 ^a
CV (%)	9,11	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Existem poucos estudos publicados com jenipapeiro em condições de conservação em longo prazo. Houve a formação de plântulas normais, com raiz e parte aérea bem desenvolvidos e sem dano aparente aos 60 dias de cultivo *in vitro* nos dois acessos (Figuras 4 A e B). Estudos publicados por Santos e Salomão (2016) relataram que após a criopreservação, eixos embrionários de *G. americana* alcançaram altas porcentagens de germinação 93%; 96% e 93%, em sementes com 13,26%; 9,57% e 6,79% de umidade.

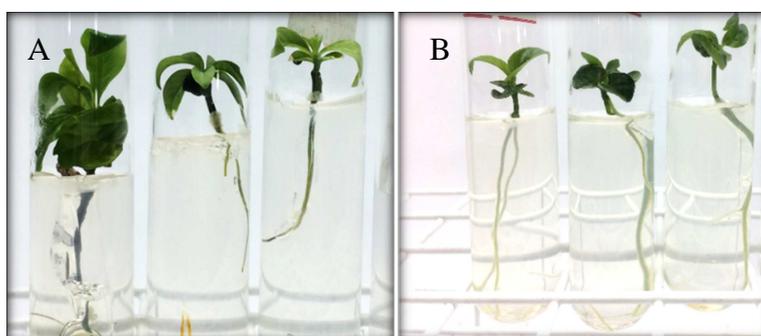


FIGURA 4. Regeneração de eixo embrionário de jenipapeiro após a criopreservação aos 60 dias de cultivo *in vitro*. A- acesso Umbaúba; B- acesso Núcleo Bandeirante.

Quanto ao crescimento médio dos dois acessos *in vitro* após a criopreservação, houve efeito significativo do tempo de dessecação para o comprimento da parte aérea e da raiz e número de folhas de plântulas regeneradas a partir dos eixos embrionários (Anexos 6A, 7A e 8A). Com o aumento do tempo de dessecação houve redução linear dos comprimentos da parte aérea e da raiz (Figuras 5 A e B). O número de folhas variou conforme equação $y = -0,0081x^2 + 0,1092x + 1,9773$ ($R^2 = 0,8192$), com redução após 16 horas de dessecação (Figura 5C).

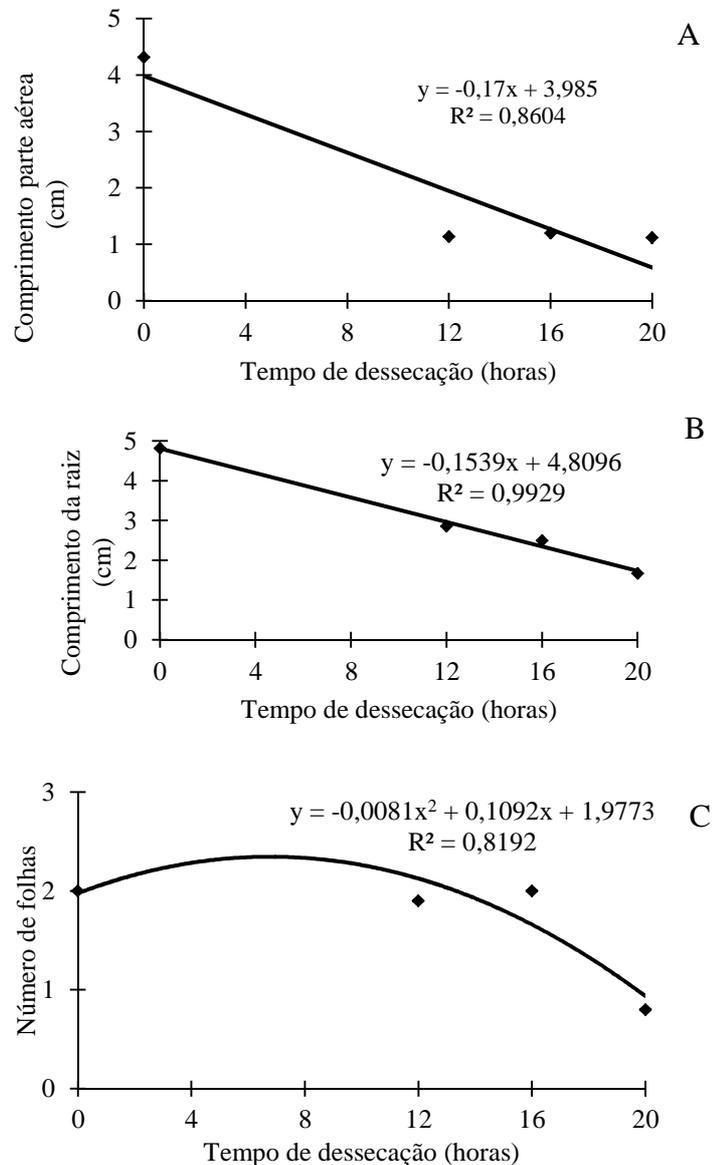


FIGURA 5. Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento de plântulas de jenipapeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro*. A- comprimento da parte aérea; B- comprimento da raiz e C- número de folhas.

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo dos acessos para comprimento da raiz e número de folhas. O acesso Umbaúba apresentou plântulas com crescimento da raiz e número de folhas superior ao acesso Núcleo Bandeirante, não sendo detectada para o comprimento da parte aérea. (Tabela 4). Este fato pode ser explicado pela maior capacidade de reidratação das células do acesso Umbaúba após a desidratação. Segundo Walters et al. (2001) as funções normais das células são alteradas quando estas são submetidas a conteúdos intermediários aos da hidratação total. Inúmeros fatores podem causar

danos e modificações no comportamento fisiológico de sementes sensíveis ao passar por processo de dessecação, entre eles destacam-se o estágio de maturação e temperatura (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). Segundo Benmahioul et al. (2015), a interação entre o teor de água de eixos embrionários no congelamento e sua viabilidade tem sido reportada em outras espécies. Outro fator que pode ser considerado é que espécies com maior área de ocorrência geográfica podem apresentar diferenças genéticas na capacidade de resposta às variações climáticas, com maior possibilidade de tolerar estresses (FERRAZ et al., 2012).

TABELA 4. Efeito do acesso no comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CRAIZ) e número de folhas (NF) de eixos embrionários de jenipapeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro* após a criopreservação.

Acessos	CPA (cm)	CRAIZ (cm)	NF
Umbaúba	1,95a	4,06a	2,70a
Núcleo Bandeirante	1,95a	1,87b	0,75b
CV (%)	31,79	34,94	22,10

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Respostas genético-dependentes após a criopreservação têm sido observadas para outras espécies. Diferenças na capacidade de regeneração e desenvolvimento de eixos embrionários de *Gossipium hirsutum* foram relatadas por Lopes et al. (2013) onde a cultivar BRS 201 apesar de apresentar maior regeneração que a BRS 200, apresentou menor comprimento de plântula e número de raízes emitidas. Kaya e Souza (2017) avaliando três genótipos de *Saccharum officinarum* em diferentes técnicas de criopreservação de meristemas apicais constaram diferenças na regeneração e crescimento. Alta genótipo-dependência também foi relatada por Souza et al. (2016) entre acessos de *Ananas comosus*.

Como análise complementar ao efeito da dessecação e da criopreservação nos eixos embrionários de acessos de jenipapeiro, foi realizada a análise ultraestrutural com microscopia eletrônica e microscópio óptico. A morfologia externa do embrião zigótico não criopreservado apresentou células extremamente organizadas, com parede celular íntegra. O eixo embrionário apresentou formato cilíndrico com a ponta da radícula arredondada e sem lesões aparentes e os cotilédones forma arredondada com ausência de danos visuais em sua estrutura (Figura 6).

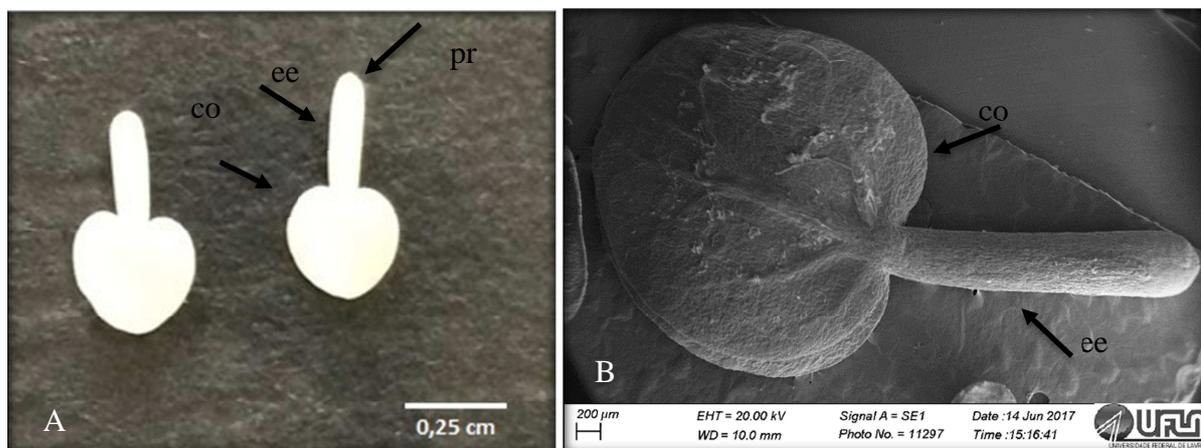


FIGURA 6. Estruturas do embrião zigótico do jenipapeiro não criopreservado. A- superfície do embrião zigótico: co - cotilédones; ee - eixo embrionário; pr - ponta da radícula; B- superfície do embrião zigótico em microscópio eletrônico de varredura.

Sementes submetidas a 12 horas de dessecação apresentaram estrutura celular murcha, com redução da parede celular e aumento do espaço intracelular nas sementes antes da imersão em nitrogênio líquido (Figuras 7 A e B). Após a criopreservação e a reidratação dos tecidos por de 24 horas, as células aparentemente apresentaram menor espaço intracelular (Figuras 7 C e D).

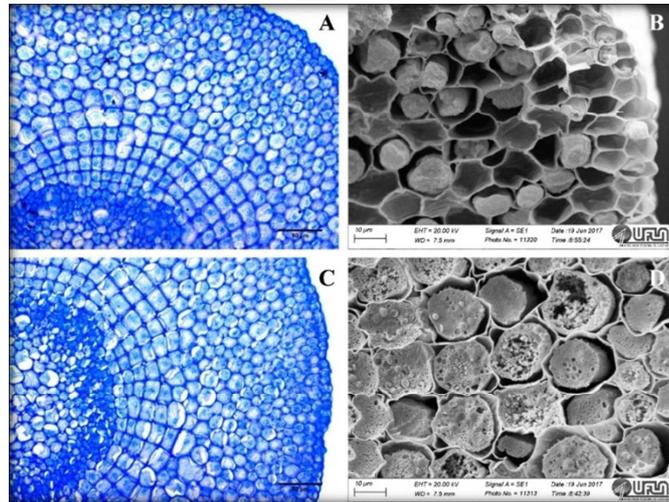


FIGURA 7. Corte transversal e eletromicrografias de varredura de eixo embrionário antes e após a criopreservação (NL), com 12 horas de dessecação. A e B- células de eixo embrionário antes NL, C e D- células de eixo embrionário após NL.

Sementes submetidas a 20 horas de dessecação apresentaram parede celular desuniforme e células murchas (Figura 8). Apesar do maior tempo de dessecação em relação ao tratamento de 12 horas (Figura 7), as células apresentaram os mesmos danos evidenciados acima.

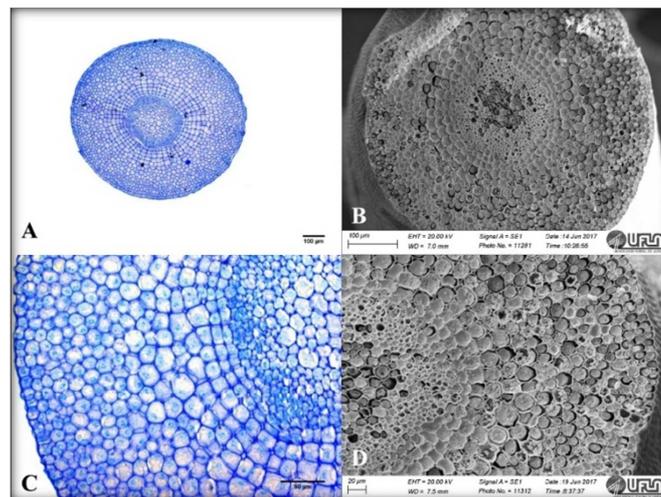


FIGURA 8. Corte transversal e eletromicrografias de varredura de eixo embrionário de jenipapeiro antes e após a criopreservação (NL), com 20 horas de dessecação. A e B- eixo embrionário antes NL, C e D- eixo embrionário após NL.

Resultados semelhantes foram obtidos por Magistrali et al. (2013) com eletromicrografia de varredura de tecidos de *Genipa americana* desidratadas rapidamente até 10,2% de umidade. Alterações ultraestruturais das células foram observadas como a redução

do volume das células de armazenamento, compactação no conteúdo de reserva interno e aumento no espaço intracelular no endosperma. Sementes com 5,4% de umidade apresentaram a morfologia das células descaracterizada com perda da turgidez das paredes celulares.

O protocolo descrito acima apresenta potencial de aplicação em diferentes acessos de jenipapeiro considerando que a exposição ao NL não comprometeu a sobrevivência e regeneração dos eixos embrionários os acessos Umbaúba e Núcleo Bandeirante.

4.4 Conclusões

O acesso Umbaúba apresenta 100% de germinação em todos os tempos de dessecação antes da criopreservação e o Núcleo Bandeirante é mais sensível à dessecação.

O acesso Umbaúba apresenta redução das variáveis de crescimento com o aumento do tempo de dessecação.

Os tempos de dessecação testados não afetam as variáveis de crescimento do acesso Núcleo Bandeirante.

O tempo de dessecação não influencia a porcentagem de regeneração de eixos embrionários de acessos Núcleo Bandeirante e Umbaúba criopreservados.

As alterações observadas nas ultraestruturas do eixo embrionário de *G. americana* causadas pela dessecação não afetam a taxa de germinação nas sementes criopreservadas.

4.5 Referências Bibliográficas

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: Editora UFLA/FAEPE. 43p. 2004.

BENMAHIOUL, B.; DAGUIN, F.; KAÏD-HARCHE, M. Cryopreservation of *Pistacia vera* embryonic axes. **Journal of Forest Science**, Prague, v. 61, n. 4, p. 182-187, 2015.

BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York: Springer. p. 15-32. 2008.

BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E.E.; HARDING, K.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, S. J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 47, p. 65-81, 2011.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, p. 445, 1994.

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

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, p. 234, 2009.

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. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 275-291, 2009.

FERRAZ, R. L. S.; MELO, A. S.; SUASSUNA, J. F.; FERREIRA, R. S.; FERNANDES, P. D. Desenvolvimento e produção de ecótipos de feijoeiro cultivados na época das águas, sob irrigação suplementar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 920-928, 2012.

Disponível em:

<<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13655/11102>>. Acesso em: 16 out. 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons.

Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 38, n. 2, pp.109-112, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 jul. 2017.

FIGUEIREDO, M. A.; COELHO, S. V. B.; ROSA, S.D.V.E. da; VILELA, A. L.; SILVA, L. C. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017. Disponível em:<

<https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n2171123>>. Acesso em: 18 out. 2017.

FIORE, C. L. Sílica gel para uso magistral. **Revista Técnica do Farmacêutico**, São Paulo, p.14-16, 2013.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 5, n. 6, p.7 78-800, 2011.

KAYA, E.; SOUZA, F. V. D. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, Berlin, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-017-9837-2>>. Acesso em: 19 out. 2017.

KAYA, E.; SOUZA, F. V. D.; YILMAZ GÖKDOĞAN, M.; CEYLAN, M.; JENDEREK, M. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish Journal Biology**, Ankara, v. 41, p. 242-248, 2017.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Ed). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. London: CABI, p. 149-184, 2002.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste Brasileiro**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Sementes) - Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2005.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. A. C.; CARVALHO, J. M. F. C.; BRUNO, R. L. A. Criopreservação de eixos de embriões zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.

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**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.

OLIVEIRA, L. M.; SILVA, E.O.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, E. U. Períodos e ambientes de secagem na qualidade de sementes de *Genipa americana* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 2, p. 495-502, 2011.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. New York: **Horticultura Reviews**, v. 13, n. 1, p. 213, 1997.

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**, Amsterdam, v. 311, p.256-263, 2014.

PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R.; NERY, F. C.; PAIVA, P. D. O.; REIS, M. V.; SILVA, L. C. Criopreservação de gemas laterais de mangabeira: o papel da prolina. **Revista Saúde e Ciência**, Campina Grande, v. 3, n. 3, p. 86-93, 2014.

PÉREZ-GARCIA, F.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; S. C. B. R. RAO, N.K.; DULLOO, M.E.; GHOSH, D.N.; LARINDE, M. **Manual para el manejo de semillas en bancos de**

germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma. No. 8. Bioersivity International, Roma, Itália, 164p. 2007.

QUEIROZ, S. E.; DA SILVA, E. A.; DAVIDE, A. C.; JOSÉ, A. C.; SILVA, A. T.; FRAIZ, A.C.; FARIA, J. M.; HILHORST, H. W. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 144, n. 3, p. 263-76, 2012.

ROCHA, M. S. **Caracterização morfofisiológica, criopreservação e resposta à salinidade de acessos de pinhão manso.** 2010. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2010.

SÁ, F. P.; SOUZA, V. F. D.; SILVA, V. C.; LÉDO, A. S. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using in vitro culture. **International Journal of Agronomy**, London, v. 2016, p. 1-6, 2016.

SANTOS, P. A. A.; PAIVA, R.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. C.; SANTANA, M. C.; SILVA, D. P.C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for longterm storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 37, p. 289-296. 2015.

SARTOR, F. R.; MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S.; SILVA, A. V. C.; RAMOS, S. R. R. Recursos genéticos de fruteiras nativas e adaptadas do nordeste: situação do germoplasma conservado ex situ na região. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2., 2012, Bélem. **Anais...Brasília**, 2012, 1 CD-ROM.

SILVA, D. B.; SALOMÃO, A. N.; CARVALHO, P. C. L.; WETZEL, M. M. V. S. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p. 2009.

SOUZA, F. V.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. C. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 11, p. 135-148, 2001.

5. ARTIGO 2

CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA MATRIZ DE ENCAPSULAMENTO NA REGENERAÇÃO DE SEMENTES SINTÉTICAS DE JENIPEIRO

Periódico submetido (ou a ser submetido): **Ciência e Agrotecnologia**

RESUMO

A tecnologia de encapsulamento ou sementes sintéticas representa importante ferramenta no estabelecimento de protocolos eficientes de propagação e conservação. A semente sintética quando semeada sob condições *in vitro* e *ex vitro* possui a capacidade de se regenerar e formar uma nova planta, mantendo esse potencial mesmo após o armazenamento. Não existem relatos da aplicação desta tecnologia para o jenipapeiro, espécie frutífera nativa da América Tropical com comportamento intermediário de suas sementes. O objetivo foi estudar a influência da concentração de sais dos meios de cultura WPM e MS associada à matriz de alginato de sódio em ápices caulinares de *Genipa americana* L. Foram utilizados ápices caulinares do acesso SA, coletado de populações nativas de Sabinópolis, Sergipe oriundos de plântulas estabelecidas *in vitro*. Os ápices, após excisão em brotações mantidas *in vitro*, foram imersos na matriz de alginato de sódio 2,5% com os diferentes meios de cultura (MS, ½ MS, WPM e ½ WPM) e, em seguida, resgatadas individualmente e gotejadas em solução 100 mM de CaCl₂ por 20 minutos. Posteriormente as unidades encapsuladas foram submetidas a uma tripla lavagem em água destilada e autoclavada, em seguida, imersas em solução de nitrato de potássio (KNO₃) para a descomplexação por 15 minutos. Após esse período as cápsulas foram inoculadas em meio de regeneração. Para o enraizamento, as brotações oriundas de sementes sintéticas foram inoculadas em meio de regeneração MS com 0, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de AIB, e 3% de sacarose. Após a inoculação, os explantes foram mantidos na ausência de luz, por 20 dias. Após esse tempo foram transferidas para meio MS, sem reguladores de crescimento e mantidas em fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹. A indução das raízes foi observada aos 40 dias. A matriz de encapsulamento não influenciou a germinação das cápsulas.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., ápices caulinares, alginato de sódio.

NUTRITIONAL CHARACTERISTICS OF THE ENCAPSULATION MATRIX ON THE REGENERATION OF SYNTHETIC *Genipa americana* L. SEEDS

Journal of submission (or to be submitted): *Ciência e Agrotecnologia*

ABSTRACT

The technology of encapsulation or synthetic seeds represents an important tool in the establishment of efficient propagation and conservation protocols. When sown *in vitro* and *ex vitro*, synthetic seeds can regenerate and form a new plant, and even maintain this capacity after storage. To date, there are no reports on the application of this technology in the case of *Genipa americana* L. Our objective was to study the influence of salt concentrations of the media WPM and MS associated with the sodium alginate matrix on genipap shoot tips. The apices were collected from native populations in Sabinópolis, Sergipe, derived from *in vitro* seedlings. After excision, the shoot tips were immersed for 20 min in a 2.5% sodium alginate matrix with different culture media (MS, ½ MS, WPM, and ½ WPM) and then recovered individually and dripped in calcium chloride solution for capsule polymerization. Thereafter, the capsules were rinsed in distilled water, autoclaved and immersed in a potassium nitrate (KNO₃) solution for decomplexation for 15 min. The capsules were inoculated on regeneration medium. For rooting, the shoots developed from synthetic seeds were inoculated on MS regeneration medium with 0, 100, 200, 300 and 400 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) and 3% sucrose. After inoculation, the explants were maintained in the dark for 20 days. After this time, they were transferred to MS medium without growth regulators and subjected to a 12 h light/12 h dark photoperiod and light intensity of 60 μmol m⁻² s⁻¹. The regeneration percentage was not affected by the composition of the encapsulation matrix. At the tested concentrations, IBA did not induce root formation and on 100% of the shoots, calli were formed in the basal region. The absence of IBA induces rhizogenesis in shoots developed from encapsulation matrices with ½ MS, WPM and ½ WPM. The encapsulation matrix consisting of MS or WPM induces the formation of a larger number of leaves, while that composed of ½ MS induces the longest shoot length.

Key-words: *Genipa americana* L., shoot tips, sodium alginate.

5.1 Introdução

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma essência florestal nativa que ocorre naturalmente em vários estados brasileiros (ZAPPI, 2015). Explorada de forma extrativista (SILVA et al., 2009) a espécie possui características que a torna de grande importância econômica. Além disso, apresenta potencial florestal e ambiental, utilizados na recuperação de áreas degradadas e recomposição ciliar (CORRÊA et al., 2015; DURÃES et al., 2014). Na indústria alimentícia seus frutos servem como matéria prima para a fabricação de alimentos e bebidas (FERNANDES; RODRIGUES, 2012). A madeira é considerada de primeira qualidade por possuir características de elasticidade e flexibilidade, utilizada a fabricação de laminados, móveis e cabo de ferramentas (CORDEIRO; FÉLIX, 2014), e do ponto de vista etnobotânico, seus frutos, folhas e raízes são utilizados no tratamento de enfermidades (SILVA et al., 2015; VASQUÉZ et al., 2014).

Neste contexto, pela sua importância, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais é promissora à espécie, já que possui ampla utilização para a obtenção massal de propágulos com elevado padrão genético e fitossanitário (COUTO et al., 2004). Dentre as técnicas biotecnológicas, a tecnologia de encapsulamento ou sementes sintéticas representa importante ferramenta no estabelecimento de protocolos eficientes de propagação e conservação, tendo sido reportada com sucesso em espécies vegetais nativas como a mangabeira, com elevadas taxas de sobrevivência 74% e 86%, respectivamente (NOGUEIRA, 2010; PRUDENTE et al., 2017).

A tecnologia desenvolvida, por Kitto e Janick (1982), consiste no envolvimento do material vegetal como ápices caulinares em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio (BENELLI et al., 2013) que quando semeada sobre condições *in vitro* e *ex vitro* possui a capacidade de se regenerar e formar uma nova planta, mantendo esse potencial mesmo após o armazenamento (ARA et al., 2000).

A matriz de alginato de sódio que envolve os propágulos tem como principais vantagens a proteção do material vegetal, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas (GUERRA et al., 2001), baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, além de facilitar a troca de germoplasma entre instituições de pesquisa, podendo servir ainda como alternativa para a conservação de genótipos sob condições *in vitro* (SAIPRASAD, 2001). Além disso, possibilita a semeadura direta em campo, eliminando etapas de transplante e aclimatização (MARTIN, 2003).

Esta técnica tem sido continuamente aprimorada de tal maneira que vários elementos podem ser incorporados à matriz de encapsulamento, entre eles, fitorreguladores, macro e micronutrientes, carboidratos e vitaminas (GUERRA et al., 2001).

O alginato de sódio tem sido o mais utilizado como agente encapsulante, fato atribuído à sua solubilidade à temperatura ambiente, habilidade de gel permeável com o cloreto de cálcio, boa propriedade geleificante, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (GUERRA et al., 1998).

Apesar de todo o potencial da técnica, são relativamente poucos os estudos relacionados às características nutricionais da matriz de encapsulamento das unidades encapsuláveis, havendo a necessidade de inovações e, sobretudo, melhorias quanto à adequação dos tipos e concentrações dos constituintes a serem introduzidos à matriz (GUEDES et al., 2007). A definição de uma matriz de encapsulamento pode melhorar a regeneração de protocolos de conservação e micro propagação da espécie do jenipapeiro.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de sais dos meios de cultura MS e WPM associada à matriz de alginato de sódio na regeneração de ápices caulinares de *Genipa americana* L.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal

Foram utilizados como fonte de explantes ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro* de jenipapeiro acesso SA, oriundo de populações naturais em Sabinópolis, Siriri, Sergipe (acesso SA) ($10^{\circ}36'50.79''S$; $37^{\circ}07'36.05''O$).

5.2.2 Características nutricionais da matriz de encapsulamento e do meio de cultura na regeneração

Ápices caulinares foram excisados das plântulas obtidas no item 5.2.1. e misturadas à matriz de alginato de sódio 2,5%, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. As gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução de CaCl_2 100 mM de cloreto de cálcio na qual permaneceram por 20 minutos para polimerização. Para a constituição da matriz de alginato de sódio foram avaliados dois meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LOYD; MC COWN, 1981) na concentração de sais a 100 e 50%.

Em seguida, as unidades encapsuladas foram submetidas a uma tripla lavagem em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e imersas em solução 100 mM de KNO_3 para a descomplexação das cápsulas por 15 minutos (Figura 9).

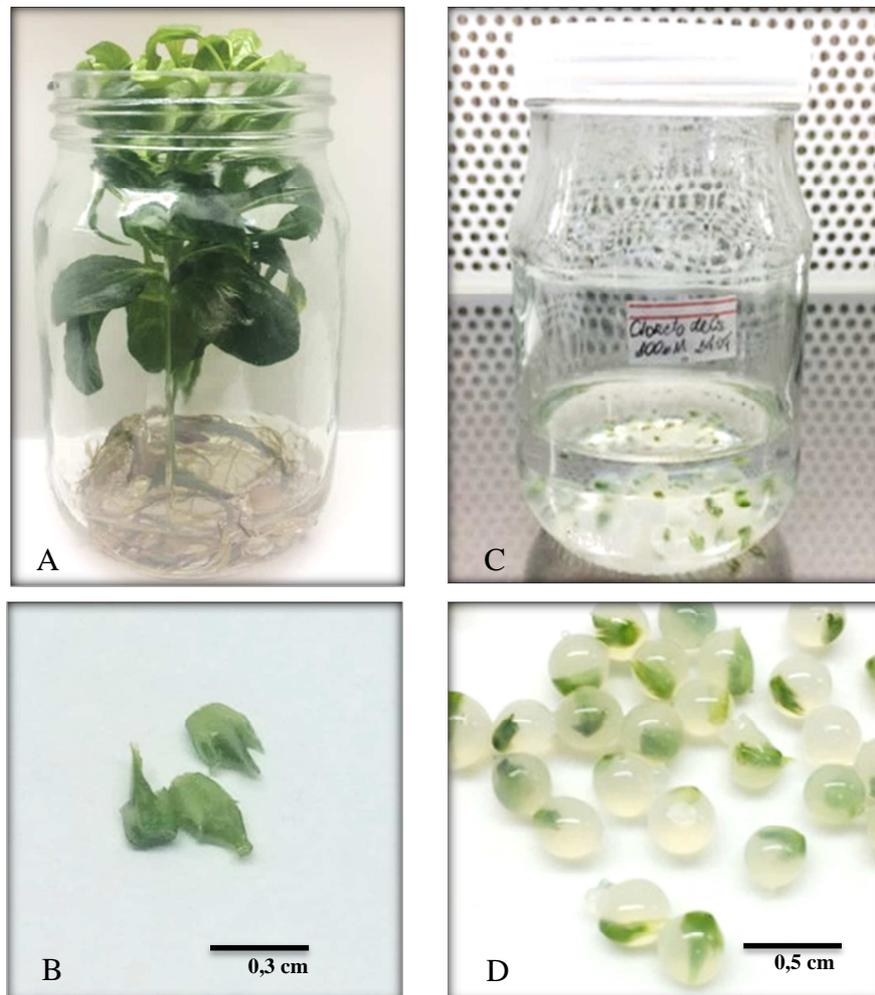


FIGURA 9. Etapas do processo de encapsulamento. A- plântulas de jenipapeiro; B- ápices caulinares; C- ápices imersos em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação por 15 minutos; D- cápsulas descomplexadas e prontas para a inoculação em meio de cultura.

Os ápices encapsulados foram inoculados em tubos de ensaio (20 mm x 170 mm) com 20 mL de meio de regeneração WPM, com concentração total (WPM) e a 50% ($\frac{1}{2}$ WPM) dos sais, e MS com concentração total (MS) e a 50% ($\frac{1}{2}$ MS). Aos meios foram acrescidos 3% de sacarose, 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,35% de Phytigel®. O pH foi ajustado para 5,8±0,1, os meios autoclavados à temperatura de 121±1 °C e pressão de 1,05 atm por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2 °C, umidade relativa do ar média em torno de 70% com fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

A porcentagem de regeneração, o número de brotações, o número de folhas e o comprimento da parte aérea foram avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo. Foram consideradas regeneradas as sementes sintéticas que apresentavam as cápsulas rompidas, a partir do desenvolvimento das gemas apicais.

5.2.3 Enraizamento das brotações oriundas de sementes sintéticas

Brotações obtidas do item 5.2.2 foram inoculadas em tubos de ensaio (20 mm x 170 mm), contendo 20 mL de meio de regeneração MS contendo 0, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de AIB e 3% de sacarose. O meio foi gelificado com 3,5 g L⁻¹ de Phytigel®, de acordo com o protocolo desenvolvido por Soares et al. (2007) modificado.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições anteriores, mas na ausência de luz por um período de 20 dias. As brotações foram transferidas para meio MS, sem reguladores de crescimento e mantidas em fotoperíodo de 12 h de luz e intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹. A indução das raízes foi observada aos 40 dias de cultivo.

5.2.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela constituída por cinco sementes sintéticas. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA et al., 2014).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Características nutricionais da matriz de encapsulamento na regeneração

Não houve efeito significativo para a porcentagem de regeneração nas quatro composições nutricionais da matriz de encapsulamento aos 30 e 60 dias de cultura *in vitro* (Anexo 1B). A regeneração dos ápices caulinares encapsulados nas composições nutricionais dos meios MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM alcançou média de 100, 94, 84 e 76%, respectivamente, aos 60 dias de cultura *in vitro* (Tabela 5). A composição nutricional das cápsulas não influenciou estatisticamente a regeneração, mas observaram-se maiores valores numéricos para a regeneração na matriz de encapsulamento constituída pelo meio MS, independente da concentração dos sais.

Este resultado pode ser explicado pela maior concentração de nitrogênio (840,90 mg L⁻¹) presente no meio MS (MIYATA et al., 2014). Este nutriente contribui de forma efetiva, tanto no metabolismo celular, como na regulação do potencial osmótico dos explantes (NAGAO et al., 1994).

As taxas de emergência dos explantes encapsulados têm sido variáveis entre diversos estudos, provavelmente ocasionada pela influência que as concentrações de alginato de sódio, agente complexante e o tempo de complexação agem sobre o explante influenciando na taxa de conversão.

TABELA 5. Influência da constituição da matriz de encapsulamento sobre a porcentagem de regeneração, número de folhas, número de brotações adventícias, comprimento da parte aérea (CPA), de jenipapeiro aos 30 e 60 dias de cultura *in vitro*.

Tempo (minutos)	Composição nutricional da matriz de encapsulamento				
	MS	½ MS	WPM	½ WPM	Médias
Porcentagem de regeneração					
30	100,00	92,00	80,00	72,00	86,00A
60	100,00	96,00	88,00	80,00	91,00A
Médias	100,00a	94,00a	84,00a	76,00a	
CV: (%) 39,06					
Número de folhas					
30	6,00	2,65	4,50	2,05	3,80 B
60	6,80	3,80	6,55	2,80	4,99 A
Médias	6,40a	3,22b	5,52a	2,42b	
CV: (%) 13,28					
Número de brotações adventícias					
30	1,10	1,00	1,10	0,90	1,02 B
60	1,50	1,00	1,10	5,50	2,27 A
Médias	1,30 b	1,00 b	1,10 b	3,20 a	
CV: (%) 40,01					
CPA (cm)					
30	1,62	0,93	1,17	0,52	1,06 B
60	1,70	1,12	1,49	0,77	1,27 A
Médias	1,66 a	1,03 bc	1,33 ab	0,65 c	
CV: (%) 35,43					

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

Sementes sintéticas de pimenta rosa encapsuladas com matriz de alginato de sódio associada aos sais de meio MS apresentaram média de 79,1% de emergência aos 30 dias da sementeira *in vitro* em meio MS sólido (GUEDES, 2007). Faria (2014) observou médias de 60 e 63% de regeneração em brotos de bananeira, clone Gorutuba encapsulados com matriz de alginato de sódio associada a 50 e 100%, respectivamente, das concentrações de sais do meio MS aos 30 dias de cultivo. Prudente (2017) obteve 86% de sobrevivência em gemas laterais de mangabeira encapsuladas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio WPM acrescido com 0,2 µM de BAP. O emprego de uma matriz de encapsulamento constituída por 75% de sais e vitaminas do meio MS, acrescida de carvão ativado (3 g L⁻¹), ou pela concentração plena do meio MS, promoveu as mais altas taxas de conversão de plantas de pimenta-longa após 30 dias da sementeira em meio de MS (PEREIRA et al.; 2008).

Existem na literatura poucos resultados da aplicação da tecnologia de sementes sintéticas para o jenipapeiro. Sá et al. (2015) observaram porcentagem de regeneração de 100% em ápices caulinares encapsulados de *Genipa americana* submetidos a 2 horas de desidratação em câmara de fluxo laminar e 24 e 48 horas de imersão em solução crioprotetora MS+0,5M de sacarose, e valor superior a 75% com 4 horas de desidratação com os mesmos tempos de imersão na solução crioprotetora.

Para a variável número de folhas houve efeito significativo da composição nutricional da matriz e dos tempos de cultivo *in vitro*, mas não houve efeito para a interação dos fatores (Anexo 2B). Não houve diferença significativa para o número de folhas dos ápices caulinares encapsulados nas composições nutricionais dos meios MS e WPM (6,40 e 5,52, respectivamente), entretanto houve para os meios ½ MS e ½ WPM (3,22 e 2,80, respectivamente). A redução dos sais pela metade, associada à matriz de encapsulamento, não

favoreceu a formação de folhas, provavelmente pela diminuição da disponibilidade de macronutrientes essenciais para o crescimento, como o nitrogênio.

Houve efeito significativo dos tempos de cultivo *in vitro*, sendo observado maior número de folhas aos 60 dias (4,99) do que aos 30 dias (3,80), confirmando o crescimento do ápice caulinar (Tabela 6). Nogueira (2010) observou que o meio WPM associado à matriz de encapsulamento em ápices de mangabeira promoveu a formação de 4,61 folhas aos 45 dias de cultivo.

Para o número de brotações adventícias houve efeito significativo do tempo de cultivo, mas não houve efeito da composição nutricional da matriz. Aos 60 dias as culturas apresentaram, em média, maior número de brotações (2,27) em relação aos 30 dias de cultivo (1,02), resposta esperada considerando a maior exposição dos brotos aos nutrientes do meio.

Para o comprimento da parte aérea, houve efeito significativo para o fator tempo e o fator meio de composição nutricional, mas sem interação significativa tempo x meio (Anexo 4B). As brotações do tratamento composto da matriz de encapsulamento associado aos sais do meio MS atingiram, em média, 1,66 cm sendo superior aos meios $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ WPM, com médias de 1,03 e 0,65 cm, respectivamente. A média observada de 1,27 cm em 60 dias foi significativamente superior a 1,06 cm aos 30 dias. Pereira et al. (2008) estudando a influência da composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa observaram que aos 15 e 30 dias de cultivo em meio MS sólido, as brotações atingiram comprimento médio de 0,40 e 0,70 cm, respectivamente.

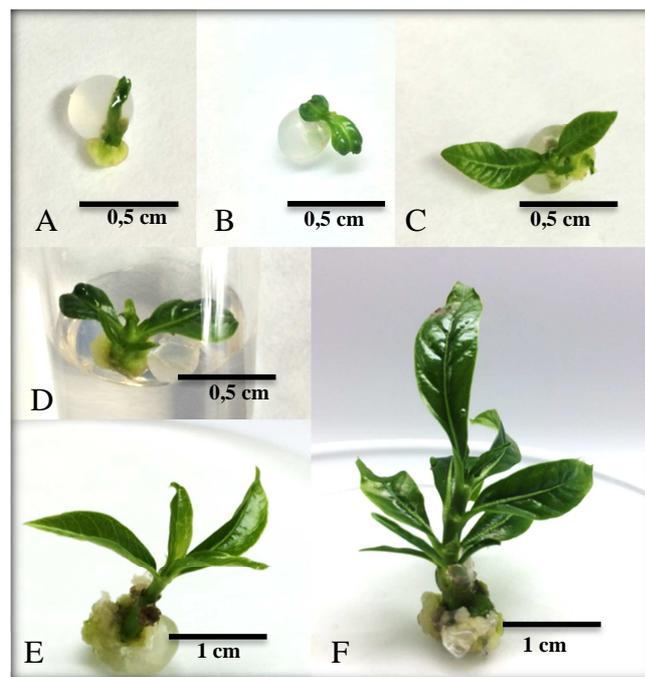


FIGURA 10. Regeneração de sementes sintéticas A - B - C - D- rompimento inicial das cápsulas até os 15 dias; E - F- brotações aos 30 e 60 dias.

5.3.2 Enraizamento das brotações oriundas de sementes sintéticas

Todas as brotações oriundas da regeneração de eixos embrionários encapsulados apresentaram formação de calo na base na ausência e presença de AIB (Figura 11A). Rocha et al. (2008) trabalhando com outros acessos de jenipapeiro (JBR 59 e JBR 69) observaram resultado semelhante, onde ocorreu formação de calos com aspecto friável e compacto. Sá et al. (2015) em estudos de regeneração de ápices caulinares encapsulados do acesso Oiteiros imersos em solução crioprotetora também relataram a presença de 100% de calogênese na base das brotações. O balanço hormonal entre citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à

planta, pode estimular a proliferação celular (NOGUEIRA et al., 2007). Provavelmente a calogênese observada na base das brotações se deva a condição submetida na fase anterior de cultivo em meio na presença de 1 mg L^{-1} BAP, associada aos níveis endógenos de auxinas.

Entretanto aos 90 dias, houve a indução de raízes em todas as brotações mantidas em meio MS na ausência de AIB, com exceção das brotações regeneradas a partir da matriz de encapsulamento com MS (Tabela 6). Apesar da presença de calos na zona de enraizamento ser indesejável, pois pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta (ERIG et al., 2004), as brotações apresentaram formação de raízes vigorosas (Figura 11B).

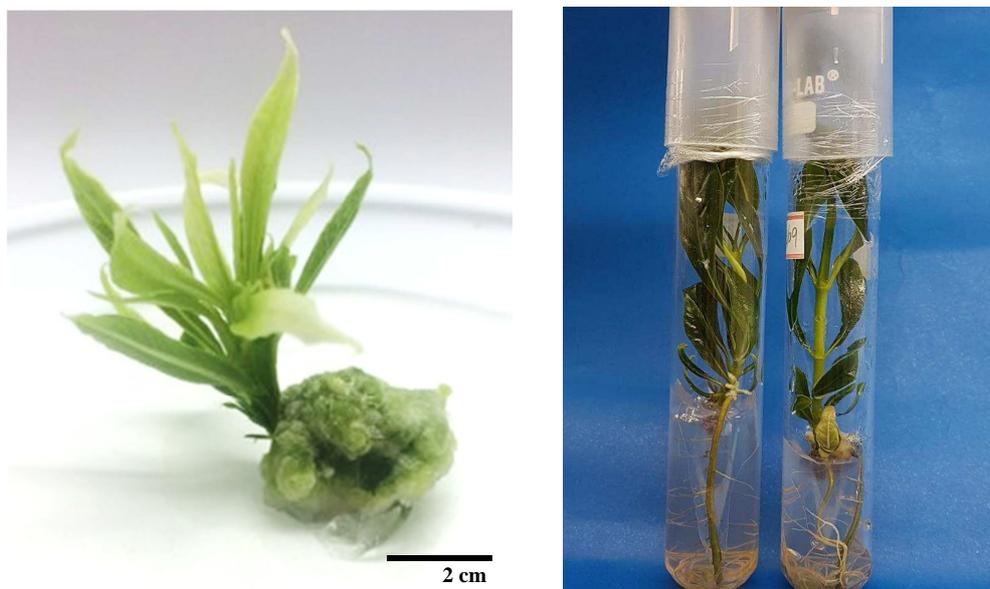


FIGURA 11. A- calo desenvolvido na base de brotações de sementes sintéticas de jenipapeiro; B- rizogênese em brotações de sementes sintéticas em meio MS sem ácido indolbutírico.

TABELA 6. Número de raízes e comprimento da raiz principal em brotações regeneradas a partir de ápices caulinares encapsulados em diferentes matrizes de encapsulamento de jenipapeiro em meio MS na ausência de ácido indolbutírico.

Matriz de encapsulamento	Número de raízes	Comprimento da raiz (cm)
MS	0,0b	0,0b
½ MS	2,7a	9,7a
WPM	1,6a	6,2a
½ WPM	2,8a	8,0a
CV (%)	15,07	41,96

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

Os resultados obtidos são promissores para o estabelecimento da tecnologia de sementes sintéticas para o jenipapeiro. Estudos posteriores deverão ser conduzidos para promover um eficiente enraizamento das brotações regeneradas sem a indução de calos.

5.4 Conclusões

A porcentagem de regeneração não é afetada pela composição da matriz de encapsulamento.

O ácido indolbutírico nas concentrações testadas não induz a formação de raízes e 100% das brotações apresentam calogênese na região basal.

A ausência de ácido indolbutírico induz a rizogênese em brotações oriundas de matrizes de encapsulamento com $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM.

A matriz de encapsulamento composta pelo MS ou WPM induz a formação de maior número de folhas.

A matriz de encapsulamento composta pelo meio $\frac{1}{2}$ MS induz o maior comprimento de parte aérea.

5.5 Referências Bibliográficas

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Semente sintética: perspectivas e limitações. **Current Science**, Bangalore, v. 78, p. 1438-1444, 2000.

BENELLI, C.; CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 31, p.171-185, 2013.

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 Medicinai**s, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

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.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

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.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. Mc e adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 61-68, 2004.

FARIA, N. A. R.; COSTA, A.M.; LONDE, N.L.; SILVA, F.J.; RIBEIRO, E.B. Influência da composição da matriz de encapsulamento de microbrotos de banana (*musa* sp.) cv. prata-anã clone gorutuba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 472-478, 2014.

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 Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p.109-112, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542014000200001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 jul. 2017.

GUEDES, S. R.; COSTA, S.H.F.; PEREIRA, J.E.S. características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p.1005-1011, 2007.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, v. 2. p. 533-568. 1998.

- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DU CROQUET, P. H. J.; NODARI, R.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n.2, p.117-128, 2001.
- KITTO, S. K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488, 1982.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MARTIN, K. P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Reichb. F.) J. D. HOOK, an endangered orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 9, p. 322-326, 2003.
- MIYATA, L.Y., VILLA, F., PASQUAL, M.; Meios de cultura utilizados na micropropagação de híbridos de orquídeas. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1731-1738, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.
- NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação in vitro de brotações de porta-enxerto de citros. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.
- NOGUEIRA, G. F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas in vitro de mangabeira**. 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, 2010.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; SOARES, G. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; OLIVEIRA PAIVA, P. D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.
- PEREIRA, J. E. S.; GUEDES, R. S.; COSTA, F. H. S; SCHMITZ, G. C. B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 093-096, 2008.
- PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R.; NERYF, C.; REIS, M. V.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, L. C. Encapsulation of lateral buds of *Hancornia speciosa*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 7, p. 59-64, 2017.
- 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 aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.760-774, 2008.
- SÁ, F. P.; SOUZA, V. F. D.; SILVA, V. C.; LÉDO, S. A. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.
- SAIPRASAD, G. V. S. Artificial seeds and their application. **Resonance**, p. 39-47, 2001.

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.

SILVA, D. B.; VIEIRA R. F. **Frutas nativas da região Centro Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 304-322. 2009.

SOARES, F. P.; PAIVA, R; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; ENRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1048-1053, jul/ago. 2007.

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. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes do jenipapeiro são classificadas como intermediárias, por apresentarem certa tolerância à dessecação em função do método de secagem e, não suportarem longos períodos de armazenar com período máximo de armazenamento 60 dias. Este fato, impossibilita a formação de bancos de sementes tão práticos quanto ao manuseio e uso.

Considerando a necessidade de desenvolvimento de técnicas complementares à conservação *ex situ* em campo na forma de coleções ou bancos de germoplasma, os resultados obtidos no presente trabalho são promissores.

O protocolo de criopreservação de eixos embrionários apresenta potencial de aplicação em diferentes acessos de jenipapeiro considerando que a exposição ao nitrogênio líquido não comprometeu a sobrevivência e regeneração dos eixos embrionários de acessos oriundos de regiões distintas no Brasil.

Os resultados obtidos para o estabelecimento da tecnologia de sementes sintéticas para o jenipapeiro também é promissor, havendo necessidade de ajustes na etapa de enraizamento e estudos de tempo e condições de armazenamento das sementes sintéticas.

