



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITOS DA SECAGEM E
SALINIDADE NA PROPAGAÇÃO DO JENIPAPEIRO**

MILENA NASCIMENTO CARDOSO

2019



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

MILENA NASCIMENTO CARDOSO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITOS DA SECAGEM E
SALINIDADE NA PROPAGAÇÃO DO JENIPAPEIRO**

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

Orientador
Prof. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2019

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

C268d Cardoso, Milena Nascimento
Diversidade genética e efeitos da secagem e salinidade na
propagação do jenipapeiro / Milena Nascimento Cardoso ;
orientadora Ana Veruska Cruz da Silva. – São Cristóvão, SE,
2019.
67 f. : il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) -
Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Jenipapo. 2. Jenipapo - Semente. 3. Biotecnologia - Semente.
4. Sementes – Conservação. I. Silva, Ana Veruska Cruz da, orient.
II. Título.

CDU 606:582.936.1

MILENA NASCIMENTO CARDOSO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITOS DA SECAGEM E
SALINIDADE NA PROPAGAÇÃO DO JENIPAPEIRO**

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

APROVADA em 31 de julho de 2019.

Profa. Dra. Ana da Silva Ledo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/PPGAGRI-
UFS

Prof. Dr. Marcelo A.G. Carnelossi
Universidade Federal de Sergipe

Dra. Priscilla Santana Santos
ADEMA - SE

Dra Caroline Araújo Machado
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva
Embrapa Tabuleiros Costeiros/PPGAGRI-UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais, maiores divulgadores e
incentivadores do meu sucesso,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À minha família, base de tudo que sou. Obrigada por cada momento de amparo, sorrisos e pela companhia nos bons e maus momentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa do doutorado.

À EMBRAPA, em especial a Embrapa Tabuleiros Costeiros, pelo aporte de recursos.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), em especial ao PPGAGRI, pela oportunidade.

À minha orientadora Dra Ana Veruska Cruz, obrigada por toda paciência em ensinar, por todas as conversas e apoio integral a todas as ideias que tivemos ao longo desses três anos.

À Dra Ana Ledo e Dr Evandro Muniz, por toda contribuição e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Silvio Gomes, Isa Ribeiro e Alex Souza. Obrigada por cada palavra e cada sorriso mesmo nos dias em que nada deu certo! Nesse quesito, um agradecimento especial a Ana Letícia, por ter sido amiga em todas as horas, por ouvir, corrigir e contribuir com meu trabalho!

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Inácio, Lucas e Fernanda, por todo apoio e suporte quando precisei e todos os sorrisos e histórias vividos nesses anos de convivência.

A quem completa meu quarteto: Leila, Carol e Annie. Obrigada por serem companheiras e amigas também foram do âmbito de trabalho, por deixarem as coisas mais leves quando tudo parecia nublado.

À Edice Fontes, por me ajudar semanalmente a enfrentar todos os desafios pessoais e profissionais. A você meu MUITO OBRIGADA!

Aos funcionários do Campos Experimental Jorge Sobral, em especial ao Sr. Genisson, por ajudar nas avaliações e no cuidado que sempre teve conosco.

Aos colegas de Programa de Pós-Graduação em Agronomia e Biodiversidade, por compartilhar e comemorar sempre as vitórias de cada um.

Aos amigos da graduação que contribuíram com sorrisos e me ouviram sempre que precisei: Deborah, Francisco Jr, Daiany, Marianna, Marcélio, Arthur e Egival.

Aos professores que contribuíram com o crescimento pessoal e profissional.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.

A todos, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Jenipapeiro: principais características e formas de uso	3
2.2 Aspectos sobre a propagação do jenipapeiro	5
2.3 Uso de marcadores moleculares na diversidade genética de jenipapeiro	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
4. ARTIGO 1: Diversidade genética em populações nativas de <i>Genipa americana</i> (Rubiaceae)	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
4.1. INTRODUÇÃO	17
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.2.1. Amostragem, coleta e extração de DNA.....	18
4.2.2 Amplificação por PCR.....	19
4.2.3 Análise dos dados	19
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.4. CONCLUSÕES	24
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. ARTIGO 2: Qualidade fisiológica e tolerância de sementes de jenipapo submetidas à secagem.	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
5.1. INTRODUÇÃO	28
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.5. CONCLUSÕES	33
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
6. ARTIGO 3: Potencial fisiológico e crescimento <i>in vitro</i> de jenipapeiro (<i>Genipa americana</i> - Rubiaceae) sob salinidade.	38

RESUMO	38
ABSTRACT.....	39
6.1 INTRODUÇÃO	39
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
6.2.1 Germinação sob salinidade.....	40
6.2.2 Enzimas antioxidantes.....	41
6.2.3 Crescimento <i>in vitro</i> de acessos de jenipapeiro em meio de cultura salino	42
6.2.4 Quantificação de prolina	43
6.2.5 Delineamento experimental.....	43
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.3.1 Efeito da salinidade na germinação.....	43
6.3.2 Enzimas antioxidantes.....	45
6.3.3 Efeito da salinidade no crescimento <i>in vitro</i> de micrestacas.....	47
6.3.4 Efeito da salinidade no conteúdo de prolina	51
6.4 CONCLUSÕES	53
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura	Página
1 Abrangência da coleta de acessos de <i>Genipa americana</i> L. para avaliação da diversidade genética.....	19
2 Coeficiente de correlação e número de fragmentos obtidos a partir do uso de nove marcadores ISSR na diversidade genética de populações naturais <i>G. americana</i> L. obtidos pelo método de <i>bootstrap</i>	21
3 Variância de fragmentos polimórficos usando marcadores ISSR entre 73 genótipos de <i>G. americana</i> L.....	21
4 Representação filogenética do Método do Grupo de Pares Não Ponderados usando o agrupamento de médias aritméticas (UPGMA) estimado pela similaridade genética do coeficiente de Jaccard, pela análise de bootstrap (10 000x) e grupos (C1 e C2) de 73 indivíduos de <i>G. americana</i> L.....	23
5 Análise de Componente Principal (PcoA) de populações naturais de <i>G. americana</i> L. do estado de Sergipe, Brasil.....	24

ARTIGO 2

Figura	Página
1 Teor de umidade (A); Porcentagem de germinação (B), Germinabilidade média (C) Índice de Velocidade de Emergência (D) de sementes de jenipapo submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.....	31
2 Comprimento (A); área foliar (B); Massa seca (C); Massa fresca (D) e número de folhas (E) de plântulas de jenipapeiro oriundas de sementes submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.....	33

ARTIGO 3

Figura	Página
1 Porcentagem de germinação (A), Germinabilidade média (B) Índice de Velocidade de Germinação (C) de sementes de jenipapo submetidas a estresse salino (0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl)	44
2 Efeito da salinidade <i>in vitro</i> no número de raízes (A), comprimento (B), número de folhas (C), número de brotos (D), número de gemas (E) e massa seca (F) de plântulas de jenipapeiro nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl. ■ Acesso CER; ♦ Acesso SA; ● Acesso CRA.....	50
3 Conteúdo de prolina em acessos de jenipapeiro submetidas ao estresse salino <i>in vitro</i> aos 30 (A), 60 (B) e 90 dias (C). ■ genótipo CER; ♦ genótipo SA; ● genótipo CRA.....	52

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	. Marcadores ISSR utilizados em populações naturais de <i>G. americana</i> L. do Estado de Sergipe, Brasil, com suas respectivas sequências, temperaturas de anelamento (Ta), total de fragmentos (TF), fragmentos polimórficos (FP) e porcentagem de polimorfismo (PPF).....	20
2	Pares de genótipos com maiores e menores valores de similaridade (S) baseados no Coeficiente de Jaccard, calculado a partir de nove marcadores em 73 indivíduos de <i>Genipa americana</i> L.....	22

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Efeito da secagem na germinação e germinabilidade de sementes de jenipapeiro submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.....	32

ARTIGO 3

Tabela		Página
1	Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo da Embrapa Tabuleiros Costeiros utilizados para ensaio de salinidade <i>in vitro</i>	42
2	Efeito das concentrações salinas (0; 25; 50; 75 e 100mM) na germinação e germinabilidade de sementes de jenipapeiro.....	44
3	Atividade de enzimas antioxidantes em sementes de acessos de jenipapeiro submetidas a diferentes concentrações salinas (0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl) em diferentes tempos (0; 72; 144; 216; 288 e 360 horas)	46
4	Número de raízes, comprimento de plântula, número de folhas, número de brotos, número de gemasdiâmetro de caule e massa seca de três acessos de jenipapeiro submetidos ao estresse salino <i>in vitro</i> nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl.....	48
5	Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) em acessos de jenipapeiro sob cultivo em meio salino nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl aos 30, 60 e 90 dias.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol. g}^{-1}$	Micromol por grama
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxila
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftaleno acético
APX	Ascorbato Peroxidase
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
BAP	Ácido indol-3-butírico
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (<i>Biochemical Demand Oxygen</i>)
C	Carbono
CAT	Catalase
Cl^-	Cloreto
Cm	Centímetros
CV	Coeficiente de Variação
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dS. m^{-1}	Decisiemens por metro
ϵ	Coeficiente Molar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas em Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
<i>G. americana</i>	<i>Genipa americana</i> L.
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
He	Heterozigosidade esperada
I	Índice de Shanon
IBA	Ácido indolbutírico
ISSR	Repetições Inter Sequenciais Simples (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)
mA	Miliampere
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
MPa	Megapascal
MS	Meio Murashige e Skoog (1962)
N	Nitrogênio
Na	Número de alelos esperados
Na^+	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NBT	p-nitro azul de tetrazólio
Ne	Número de alelos efetivos
$\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$	Nanograma por microlitro
nm	nanômetro
O_2	Molécula de Oxigênio
$\text{O}_2 \bullet^-$	Superóxido
O_2^1	Oxigênio singleto
p/v	Peso por volume
pb	Pares de base
PCoA	Análise de Coordenadas Principais (<i>Principal Coordinates Analysis</i>)
PCR	Reação em Cadeia Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico

PVP	Polivinilpolipirrolidona
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TE	Tampão de Extração
U/ μ L	Unidade por Microlitro
UPGMA	Método de Grupo de Par Não Ponderado usando Médias aritméticas (<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>)
V	Volts
v/v	Volume por volume
W	Watt
ΔA	Variação média da absorbância
μ mol / min. g	Micromolar por minuto por grama

RESUMO

CARDOSO, Milena Nascimento. **Diversidade genética e efeitos da secagem e salinidade na propagação do jenipapeiro**. São Cristóvão: UFS, 2019. 74p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade). *

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma frutífera nativa do Brasil, pertencente à família Rubiaceae. Tem amplo destaque tanto em sua distribuição espacial, que ocorre do México à Patagônia, quanto por suas formas de uso. Trata-se de uma espécie sucessional tardia, indicada para áreas de restauração florestal e que também apresenta atividades farmacológicas e consequente potencial comercial. A destruição de habitats naturais para espécie, aliado ao seu uso extensivo, justificam uma maior demanda de pesquisas. Estudos sobre a diversidade genética em populações naturais e o domínio de conhecimentos técnicos a respeito de sua propagação são de suma importância no fornecimento de critérios essenciais ao pré-melhoramento, estratégias de conservação e exploração comercial do jenipapeiro. O objetivo desse trabalho foi caracterizar aspectos germinativos (secagem e salinidade) e genéticos em populações de *Genipa americana* L. A diversidade genética foi estimada por marcadores ISSR em 15 populações naturais de jenipapeiro do Estado de Sergipe. No estudo da influência da secagem, as sementes foram beneficiadas e submetidas a diferentes períodos de secagem (0; 24; 48; 72; 96 e 120 h) sob temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e semeadas em sacos de polietileno contendo substrato comercial e pó de coco. Para avaliar os efeitos do estresse salino no potencial fisiológico das sementes e no crescimento *in vitro*, elas foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl (0; 25; 50; 75 e 100mM). A cada 72h foram extraídos eixos embrionários para determinação da atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Para verificação do crescimento inicial sob salinidade *in vitro*, explantes de acessos NB, SA e SF foram inoculados em meio MS acrescido das concentrações 0; 25; 50; 75; 100mM e avaliados após 90 dias. Além disso, a prolina foi quantificada aos 30, 60 e 90 dias após inoculação dos explantes ao meio salino. Nos experimentos sobre propagação, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Constatou-se alta taxa de polimorfismo (100%), índice de Shanon de 0,36 e divisão dos indivíduos em dois grupos distintos. A viabilidade foi mantida em 80% no período de secagem de 48h, quando a umidade foi de 32% e o crescimento inicial foi afetado após 96 h de secagem. Verificou-se que a concentração de 50mM de NaCl afeta o potencial fisiológico das sementes e a salinidade aumenta a atividade das enzimas SOD e APX até 288 horas de exposição ao estresse salino. O estresse salino provoca diminuição no crescimento *in vitro* da espécie, sendo que o acesso SA apresentou maior tolerância a salinidade. Aumento de sal ao meio ocasionou incremento de prolina aos 30, 60 e 90 dias, indicando seu uso como marcador bioquímico para estresse em jenipapeiro.

Palavras-chave: *Genipa americana* L.; Conservação; Sementes; Enzimas Antioxidantes; Prolina.

* Comitê Orientador: Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros/ PPGAGRI-UFS (Orientador).

ABSTRACT

CARDOSO, Milena Nascimento. **Genetic diversity and effects of drying and salinity on genip tree propagation.** São Cristóvão: UFS, 2019. 74p. (Thesis – Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity). *

The genip tree (*Genipa americana* L.) is a native tree from Brazil, belonging to the Rubiaceae family. This tree is widely prominent both in its spatial distribution – occurring from Mexico to Patagonia – and in its forms of use. This is a late successional species indicated for forest restoration areas, and its fruit –genipap – presents pharmacological activities and consequent commercial potential. The destruction of natural habitats for this species, coupled with their extensive use justify a greater demand for research. Studies on genetic diversity in natural populations, and on the mastery of technical knowledge about their propagation are crucial for providing essential criteria for pre-breeding, conservation strategies and commercial exploitation of genipap. The objective of this study was to characterize germination (drying and salinity) and genetic aspects in populations of *Genipa americana* L. Genetic diversity was estimated by ISSR markers in 15 natural populations of genip tree from the state of Sergipe, Brazil. In the study of the influence of drying, the seeds were benefited and submitted to different drying periods (0; 24; 48; 72; 96 and 120 h) at $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and sown in polyethylene bags containing commercial substrate and powdered manure. To evaluate the effects of saline stress on seed physiological potential and growth *in vitro*, the seeds were submitted to different NaCl concentrations (0; 25; 50; 75 and 100 mM). Every 72 h embryonic axes were extracted to determine the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX). To verify the initial growth under salinity *in vitro*, accessions explants NB, SA and SF were inoculated in MS medium plus concentrations 0; 25; 50; 75 and 100 mM and evaluated after 90 days. Proline was quantified at 30, 60 and 90 days after inoculation of the explants in saline medium. In the propagation experiments, a completely randomized design with four replications of 25 seeds was used, totaling 100 seeds per treatment. High polymorphism rate (100%), 0.36 Shannon index and division of individuals into two distinct groups were found. Viability was maintained at 80% in the 48h drying period, when humidity was 32% and the initial growth was affected after 96 h of drying. The 50 mM NaCl concentration was found to affect seed physiological potential and salinity increased the activity of SOD and APX enzymes up to 288 hours of exposure to saline stress. Saline stress causes a decrease in *in vitro* growth of the species, and the SA access showed higher tolerance to salinity. Salt increase in the medium caused proline increase at 30, 60 and 90 days, indicating its use as a biochemical marker for stress in genip trees.

Keywords: *Genipa americana* L., conservation, seeds, antioxidant enzymes, proline.

* Supervising Committee: Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros/ PPGAGRI-UFS.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Rubiaceae (SEMEDO & BARBOSA, 2007) e tem destaque por sua ampla distribuição geográfica do México à Patagônia (DELPRETE et al., 2005). No Brasil, a espécie pode ser encontrada na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (GOMES, 2019). O fruto é popularmente conhecido como jenipapo, janapabeiro, janipaba, bi, caruto, guaitil, jagua e guasu (CARVALHO, 2003; STRUWE, 2002) e seu período de frutificação ocorre entre os meses de maio e agosto, produzindo um fruto de cor amarronzada quando maduro (ALVES, 2011).

Trata-se de uma espécie sucessional tardia capaz de sobreviver e se estabelecer sob dossel de florestas em estágios mais jovens (CARVALHO, 1994). As mudas de *G. americana* sobrevivem longos períodos sob solo inundado (MIELKE et al., 2003) e as plantas adultas agem como fitorremediadoras em solos contaminados (SANTANA et al., 2012), sendo recomendada para áreas de restauração florestal, matas ciliares e sucessões florestais.

Praticamente todas as partes da árvore são aproveitadas. Os frutos *in natura* são utilizados na alimentação humana, na fabricação de doces, compotas, sucos, refrescos, licor, vinho e aguardente (RENHE, 2008). Alguns estudos revelaram potencial medicinal na goma extraída do tronco das árvores de jenipapeiro e no chá de suas raízes (RENHE, 2009). O extrato das folhas é rico em polissacarídeos, sendo caracterizada como farmacologicamente promissora (NONATO et al., 2018; SOUZA et al., 2018), conferindo à espécie, uso na indústria alimentícia, campos farmacológicos e biomédicos (NERI-NUMA et al., 2017).

A destruição dos habitats naturais ameaça a integridades dos recursos genéticos de frutíferas, sendo que a consequência mais direta da fragmentação dessas áreas são as alterações nos padrões de troca de genes e modificações na variabilidade e estrutura genética (BALLAL et al., 1994). Nesse contexto, o estudo da diversidade genética em populações naturais é de suma importância, pois podem fornecer critérios essenciais para o processo de pré-melhoramento e definir táticas de conservação, principalmente as que garantem a continuidade do processo evolutivo das populações ao longo do tempo (RAO & HODGKIM, 2002).

Em estudo com populações naturais de jenipapeiro do baixo São Francisco sergipano, Rabbani et al (2012), por meio da semelhança genética, encontraram indivíduos que podem funcionar como matrizes fornecedoras de sementes em programas de restauração de áreas degradadas. Silva et al (2016) em trabalho com populações naturais arará (*Psidium guineense* Sw.), uma frutífera nativa do Brasil, encontraram alta diversidade genética, consequência da forma reprodutiva por alogamia e a falta de restrição de fluxo gênico.

O jenipapeiro está entre as frutas nativas com potencial uso comercial, porém com exploração extrativista, em razão da falta de conhecimento de quem as utiliza. Muitas espécies frutíferas encontradas no Brasil, como jenipapeiro, apresentam escassez de dados acerca da morfologia, produção, características fisiológicas e fenologia. Essas informações são importantes para descrição e caracterização de genótipos, possibilitando a incorporação de muitas espécies aos sistemas produtivos comerciais, contribuindo também para a conservação dos recursos genéticos (CARVALHO et al, 2002).

Para exploração de uma espécie nativa, o domínio de conhecimentos técnicos a respeito de sua propagação é fundamental para a definição de estratégias de exploração. Estudos sobre a propagação de espécies vegetais são essenciais para o melhoramento genético da espécie e para produção de mudas (TAKATA et al., 2014). A importância da secagem de sementes com comportamento intermediário consiste principalmente na contribuição para a preservação da qualidade fisiológica durante o armazenamento, como também possibilita a antecipação da colheita evitando perdas de natureza diversa durante o processo produtivo (GARCIA et al., 2004).

Os resultados do processo de secagem a conteúdos de água não letais à semente permitem sua sobrevivência e produções de alta qualidade, considerando que a redução da quantidade de

água no material diminui a atividade biológica e as mudanças químicas e físicas que ocorrem durante o armazenamento, permitindo que a semente não sofra danos provocados pelo excesso de água, com a possibilidade de manter a qualidade inicial do lote (BAUDET et al., 1999). Sob condições de dessecação em até três horas, as sementes de jenipapo demonstraram resultados microbiológicos satisfatórios (ANDRADE et al., 2003) e qualidade fisiológica com período de secagem de até 48 horas (OLIVEIRA et al., 2011).

Além da secagem, informações sobre comportamento do jenipapeiro sob diferentes estresses abióticos são cruciais no desenvolvimento de técnicas de propagação. A salinização do solo pode surgir naturalmente ou ser promovida por águas de irrigação salobra e está se tornando mais extensa como resultado do desmatamento e práticas de irrigação insustentáveis culminando na redução da produção agrícola principalmente em regiões áridas e semiáridas (MUNNS & GILLIHAM, 2015).

As plantas empregam uma variedade de mecanismos para combater a salinidade, sendo a mais importante o ajuste osmótico. Neste, todas as células devem acumular solutos suficientes para equilibrar a pressão osmótica extra dos sais acumulados, tornando-se um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para proteger e manter a turgescência celular (MUNNS & GILLIHAM, 2015; MARIJUAN & BOSCH, 2013). Dentre os solutos acumulados, a prolina destaca-se por ser um soluto com alta sensibilidade de resposta a mudanças ambientais (ASHRAF et al., 2011) e pode ser considerado um indicador bioquímico dos efeitos do estresse salino (MONTEIRO et al., 2014).

A exposição das plantas a fatores ambientais estressores, pode perturbar a homeostase celular e aumentar a produção de diversas espécies reativas em oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2 \bullet^-$), os radicais hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio singlete (O_2^1) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOYER & NOCTOR, 2005). A linha de defesa enzimática da planta que permite a detoxificação das EROs e a proteção das células vegetais é formada por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), o ascorbato peroxidase (APX). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo responsável pela dismutação do $O_2 \bullet^-$, gerando H_2O_2 e O_2 . A CAT e APX, que são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 e O_2 em água (GRATÃO et al., 2005).

A literatura atual sugere a necessidade de ampliação no conhecimento de aspectos relacionados à propagação e conservação da espécie. As informações obtidas a partir desse trabalho, juntamente com outras caracterizações importantes na domesticação da espécie, podem esclarecer lacunas que auxiliarão na formação de plantios comerciais e expansão nas formas de uso da espécie, que podem resultar em programas de melhoramento. Diante disto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar aspectos germinativos e genéticos em populações de jenipapeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Jenipapeiro: principais características e formas de uso

A espécie *Genipa americana* L. é nativa da América do Sul e cultivada em todo o Neotrópico, do México à Patagônia (DELPRETE et al., 2005). Desenvolve-se em áreas com pluviosidade entre 1.200 a 4.000 mm e com temperaturas anuais entre 18 e 28°C (LORENZZI, 1992). Pertence à família Rubiaceae, possui distribuição cosmopolita concentrada nos trópicos, incluindo aproximadamente 650 gêneros e 13000 espécies (DELPRETE & JARDIM 2012). No Brasil, ocorrem cerca de 120 gêneros e 1400 espécies, correspondendo a família mais populosa do Cerrado e importante elemento em quase todas as formações naturais (SOUZA & LORENZI, 2012).

Nesse grupo estão inseridas as espécies *Genipa americana* L. e *G. infundibuliformis* Zappi & Semir (ZAPPI, 2015). O fruto é mais conhecido como jenipapeiro, jenipapo, janapabeiro, janipaba, bi, caruto, guaitil, jagua e guasu (CARVALHO, 2003; STRUWE, 2002). *Genipa* significa mancha-escura, em tupi, ou fruto-de-esfregar; *americana* por ser próprio das Américas. O nome popular jenipapo vem da língua tupi, que significa "fruto das extremidades que dá suco" (BRAGA, 1976).

A espécie possui árvores perenifólias monoicas e indivíduos dioicos funcionais, com reprodução preferencialmente por cruzamentos (SEBBENN et al., 2004), constituindo um sistema de alogamia. Possui características de planta heliófita, semidecídua, seletiva higrófila, de ocorrência em áreas com florestas abertas e de vegetação secundárias de várzeas situadas em locais temporários ou permanentemente inundados (ANDRADE et al., 2000). Jenipapo tem folhas simples, opostas e hipostomáticas (estômatos na face inferior) (ERBANO & DUARTE, 2010).

Pode alcançar 15 m de altura, apresenta tronco reto e cilíndrico, copa estreita e arredondada. As folhas são simples, opostas, oblongo-ovadas, conaceas (possuem nervuras), curto-pecioladas com duas estipulas interpeciolares, de inserção oposta, de cor verde-escura e lustrosa, com 15 a 35 cm de comprimento e 3 a 10 cm de largura, agrupadas no extremo dos ramos (CARVALHO, 2003).

As flores são hermafroditas, brancas no início do desenvolvimento e, posteriormente, tornam-se amareladas. Os frutos são do tipo baga subglobosa, com forma ovóide, medindo de 9 a 15 cm de altura e 6,5 a 8,5 cm de diâmetro (CARVALHO, 2003). Os frutos imaturos são de cor verde e após amadurecimento tornam-se castanhos esverdeados. O exocarpo é macio, fino e enrugado. O mesocarpo é carnoso, amarelo e doce. Possuem polpa suculenta, comestível e aromática (DONADIO et al., 1998), tornando-a atraente para a fauna em geral (MAGISTRALI et al., 2013). Os frutos contêm de 150 a 500 sementes (SOUZA et al., 1999) e necessitam de cerca de 37,6% de umidade para dispersão das mesmas (QUEIROZ et al., 2012).

As sementes são achatadas e curtas, com tegumento duro e coriáceo, com 10 a 12 mm de comprimento e 1,8 mm de espessura, ligeiramente convexos ao plano e bordas arredondadas envoltas por uma polpa comestível e pouco abundante. São classificadas como intermediárias, ou seja, conseguem tolerar dessecação parcial (7 a 10% de umidade) e perde a viabilidade quando armazenadas a baixas temperaturas por longos períodos (CARVALHO & NASCIMENTO, 2000).

O embrião tem forma de espátula com comprimento médio de 6,1 mm, de cor branca, composto por dois cotilédones com eixo e raiz bem diferenciados (CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; QUEIROZ et al., 2012; MAGISTRALI et al., 2013).

G. americana é uma espécie secundária tardia, com características de clímax, sendo utilizada para arborização urbana e também por pequenos agricultores (SOARES et al., 2012). Contrapondo, a espécie *Genipa infundibuliformis* Zappi & Semir aparece em algumas formações florestais da mata atlântica litorânea e em florestas semidecíduais bem preservadas desde o Sul da Bahia até o estado de São Paulo, Brasil (ZAPPI, 2015).

A multiplicidade de usos vem chamando a atenção dos pesquisadores em várias áreas. A espécie pode ser utilizada em reflorestamentos de regiões com solo contendo altos níveis de cromo pela sua capacidade relevante de fitorremediação, fitoestabilizando Cr^{+6} e rizofiltrando Cr^{+3} sem causar danos expressivos ao seu crescimento e auxiliando o desenvolvimento da vegetação (SANTANA et al., 2012). De forma semelhante, a espécie apresenta características que auxiliam na sucessão de florestas naturais (CARNEVALE & MONTAGNINI, 2001) e por tolerar solos encharcados, é recomendada para restauração de matas ciliares (VALERI et al., 2003). Também constitui uma espécie amplamente plantada nos quintais e utilizadas na alimentação de subsistência (AMARAL & GUARIN NETO, 2008).

Na alimentação do homem, o fruto é comestível *in natura* e por possuir polpa succulenta, adocicada, é empregada no preparo de compota, doce cristalizado, sucos, refrescos, refrigerantes, licor, vinho e aguardente. A madeira do jenipapeiro de cor branca marfim, mole, elástica e flexível é empregada nas construções naval e civil e em marcenaria (RENHE, 2008). No Nordeste, além de sua importância econômica, deve-se ressaltar também, sua expressividade social e cultural sendo cascas, raízes, folhas e sementes utilizadas na medicina popular (COSTA et al., 2005). De forma geral, assim como em Sergipe, o cultivo ocorre em pequenos pomares podendo ser muito encontrado em populações naturais e em regiões de matas ciliares (SILVA et al., 2008).

A folha desta espécie é caracterizada em diferentes aspectos medicinais, sendo uma espécie nativa e farmacologicamente promissora, com diferentes usos populares, conferindo ao jenipapo uso na indústria alimentícia, campos farmacológicos e biomédicos (NERI-NUMA et al., 2017).

Por ser rico em ferro, vitaminas B1, B2, B5 e C, possui cálcio e hidratos de carbono em sua composição química, o jenipapo é empregado também na indústria cosmética para fabricação de produtos utilizados no cabelo e na pele (ALMEIDA, 1993).

Extrato de folhas rico em polissacarídeos apresentam efeitos anticonvulsivantes e antioxidativos conferindo proteção contra estresse oxidativo em receptores GABA (NONATO et al., 2018) e pode ser utilizado como antimalárica (DEHARO et al., 2001). Apresenta capacidade tripanocida, inibindo todas as formas de desenvolvimento de *Trypanosoma Cruzi*, eliminando as células por necrose com o envolvimento de espécies reativas em oxigênio (ROS) (SOUZA et al., 2018). O pó das folhas secas demonstrou diminuição de eosinófilos e auxiliou no ganho peso em ovelhas, representando uma alternativa natural anti-helmíntica em ovinos (OLIVEIRA et al., 2012).

A busca por compostos com propriedades funcionais a partir de fontes naturais tem crescido nos últimos anos à medida que as pessoas desenvolvem hábitos mais saudáveis (NERI-NUMA et al., 2017). O que abre precedentes para estudo com frutíferas nativas, tais como jenipapo. Os frutos de jenipapeiro são constituídos, principalmente, por geniposídeo, precursor da genipina, representando mais de 70% do total de iridóides (BENTES & MERCADANTE, 2014), porém também apresenta genipina em forma livre.

Genipina e seus glicosídeos iridóides relacionados representam uma opção promissora para fins farmacológicos, não apenas devido a suas propriedades de reticulação, mas também as capacidades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitrombóticas, efeitos neuroprotetores, entre outros (LEE et al., 2014; CHEM et al., 2014; BENTES, et al., 2015; BRAUCH, 2016).

O endocarpo dos frutos verdes apresenta maior teor de genipina e mesocarpo de compostos fenólicos (NATHIA-NEVES et al., 2017), levando a polpa do fruto a ser um antioxidante promissor suplementando a alimentação humana cotidiana, indústrias farmacêuticas e cosmética (OMENA et al., 2012).

O geniposídeo é o principal composto em ambas as partes dos frutos verdes do jenipapo, representando > 70% do total de iridóides, enquanto o ácido 5-cafeoilquínico é o principal composto fenólico (BENTES & MERCADANTE, 2014). O pH do fruto

imaturo é bastante favorável ao desenvolvimento do pigmento azul típico (genipina) por meio da hidrolisação do geniposídeo.

O pigmento azul obtido no jenipapo ou em combinação com outras frutas é comercialmente explorado nos EUA e na União Europeia como suco de frutas concentrados para uso como corantes isentos de certificação (BRAUCH, 2016). O estudo sobre a estabilidade da genipina como corante alimentar deve ser ampliado, visando aumentar o prazo de validade de produtos contendo o iridóide. No entanto, o pigmento à base de genipina parece uma alternativa promissora para aplicações industriais em produtos alimentícios devido à similaridade com corantes de marcas comerciais (BRAUCH, 2016; SIGURDSON et al., 2017).

Os iridóides extraídos da espécie são aplicáveis às tecnologias de biomateriais e encapsulamento (por exemplo: hidrogel, membranas, fibras, microgéis, esponjas e nanocápsulas) que são adequados para a indústria alimentícia, campos farmacológicos e biomédicos. Também foi relatado que os hidrogéis de quitosana reticulados com genipina atuam como carreadores para nanomedicamentos antibacterianos locais, promovendo taxa de cicatrização mais rápida, deposição de colágeno (MUZZARELI, 2009; GAO et al., 2014).

Na indústria alimentícia, o pré - tratamento utilizando ultrassom permite aumento da difusividade da água e redução no tempo de secagem possibilitando a fabricação de frutos secos e com menor teor de açúcar (FERNANDES & RODRIGUES, 2012). E na produção de galactooligossacarídeos, com estabilidade operacional por meio de partículas de genipina-quitosana (KLEIN et al., 2016).

2.2 Aspectos sobre a propagação do jenipapeiro

Estudos sobre a propagação de espécies vegetais é essencial, tanto para fins de melhoramento genético da espécie como para a produção de mudas (TAKATA et al., 2014). O maior número de informações levantadas sobre espécies nativas é de suma importância, bem como a conservação do seu germoplasma, pois para domesticação e incorporação dessas espécies em sistemas produtivos, é necessário conhecimento da distribuição da variabilidade genética (COSTA et al., 2011) e técnicas de plantio.

A propagação da espécie via semente é fácil e apresenta de 83% a 92% de emergência (OLIVEIRA et al., 2011). Não apresentam dormência e suportam até 60 dias de armazenamento sob baixas temperaturas (FERREIRA et al., 2007). Pesquisas sobre tecnologia de sementes de espécies nativas do Brasil, utilizando como base as Regras de Análise de Sementes (RSA), são limitadas (OSIPI et al., 2011) pelo escasso número de estudos. Estudos sobre germinação e crescimento de plantas como jenipapeiro podem contribuir para incremento na produção de mudas e difundir o uso da espécie, pois seu cultivo extrativista é consequência da falta de informações de seus usuários.

Avaliações envolvendo substratos são fundamentais para germinação e estabelecimento de plantas (COELHO et al., 2010), pois fatores com aeração, capacidade de retenção de água, podem variar entre os substratos, favorecendo ou prejudicando a germinação e crescimento das plantas (MORAES et al., 2007). Ao testar diversos substratos na germinação e crescimento inicial de plantas de jenipapeiro, Silva et al. (2018) concluíram que o solo fertilizado, em conjunto com areia e fibra de coco, juntamente com esterco bovino e areia, foram os mais eficientes na produção de mudas para a espécie. Composição semelhante foi recomendada por Mesquita et al. (2011), em que solo, esterco bovino e areia supriu a necessidade de produção de mudas em propriedades rurais. Em mudas micropropagadas, Sa et al. (2016) indicaram o uso de areia lavada, pó da fibra do coco e substrato comercial.

A germinação e o crescimento de plantas são muito suscetíveis a estresse bióticos (PATADE et al., 2011), que podem causar o atraso ou impedimento da germinação e a diminuição na taxa de desenvolvimento. Em terras inundadas, apesar da alta taxa de sobrevivência e ampla distribuição em habitats propensos a inundações do neotrópico, o crescimento do jenipapeiro é diminuído. As causas são principalmente a diminuição na abertura

estomática e a limitação da fotossíntese, seguidas da diminuição da área foliar individual, causando redução na absorção de carbono e na biomassa (MIELKE et al., 2003).

Altas concentrações salinas podem retardar a germinação (THIAM et al., 2013) e baixas concentrações salinas induzem estado de dormência, inibindo o processo e taxa de germinação (KHAN & WEBER, 2008). Ao induzir sementes de jenipapo ao estresse salino, Moura (2014) verificou aumento na porcentagem de germinação nas menores concentrações (77%) e diminuição de variáveis daquelas com aumento das concentrações salinas, consequência da toxicidade causada pela baixa absorção de água pela semente. De acordo com Santos et al. (2011) o potencial osmótico -0,3MPa garante o condicionamento osmótico em sementes de jenipapeiro sob restrição hídrica sem redução na taxa de germinação.

As plantas alteram o metabolismo de diferentes maneiras para acomodarem-se ao estresse ambiental (TAIZ & ZEIGER, 2013). Sendo assim, informações acerca do comportamento sob os diferentes estresses abióticos aos quais as espécies podem estar submetidas, são cruciais no desenvolvimento de técnicas de propagação. O cádmio induziu alterações morfológicas no núcleo celular da raiz e dos tecidos foliares de mudas de jenipapeiro, resultando em alterações anatômicas nas raízes e nas folhas, como a lignificação das paredes celulares nos tecidos radiculares (SOUZA et al., 2011).

Diversas mudanças morfológicas podem ocorrer durante induções de estresses, como alterações na composição de fosfolipídios de membranas (WOLKERS et al., 1998) e habilidade de prevenir ou reparar ataque de radicais livres (GREGGAINS et al., 2001) em sementes sob dessecação. Ao testar diferentes porcentagens de teor de umidade em jenipapeiro, Magistrali et al. (2013) observaram uma redução no poder germinativo a 10% e 5% de teor de umidade após 30 de armazenamento. Ao comparar dois ambientes de secagem (em laboratório e casa de vegetação) e várias horas de exposição, Oliveira et al., (2011) observaram redução no conteúdo de água e germinação nas sementes de jenipapo submetidas a secagem no telado. Avaliando a influência da secagem em jenipapeiro, Carvalho & Nascimento (2000) verificaram que houve redução na porcentagem de germinação a partir de níveis de umidade abaixo de 10,3%, com perda total da viabilidade a 4,2% de umidade.

O uso de técnicas biotecnológicas oriundas da cultura de tecidos de plantas tem sido amplamente empregado para auxiliar a conservação da variabilidade genética (PILATTI et al., 2011) e aumentar a taxa de sucesso na propagação de espécies. Nesse âmbito, a tecnologia de sementes sintéticas a partir de eixos embrionários é uma ferramenta promissora no sucesso de várias espécies com propagação natural problemática (MONDO & CICERO, 2008). Dessa forma, o protocolo eficiente para o estabelecimento da tecnologia de sementes sintéticas para jenipapeiro encontrado por Nascimento (2018) constitui uma alternativa para a formação de banco de sementes da espécie, pois é intermediária e não suporta armazenamento por longo tempo.

A regeneração *in vitro* de jenipapeiro a partir da conversão de embriões zigóticos em meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) é eficaz com a suplementação de 4,44 μ M de BAP (ácido indol-3-butírico) e 3,21 μ M de ANA (ácido α -naftaleno acético) (OLIVEIRA et al., 2017). De forma semelhante, concentrações de 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético) induzem aumento da resposta morfogenética na formação de calos e segmentos foliares e nodais, enquanto a ausência de BAP induz maior regeneração de brotos em segmentos nodais e foliares (ALMEIDA et al., 2015).

Na caracterização de diferentes etapas de micropropagação, Sa et al. (2016) concluíram que o BAP (ácido indol-3-butírico) favorece brotações adventícias, calogênese, aumento na formação de folhas e viabilidade sem segmentos nodais, enquanto a irmesão destes em IBA (ácido indolbutírico) induz a formação de raízes.

A informações levantadas até o momento contribuem com a elaboração de protocolos eficientes acerca da propagação de jenipapeiro. Estudos sobre aspectos ainda

pouco conhecidos auxiliam na produção de mudas em diversas situações, não restringindo as plantações a áreas convencionalmente utilizadas.

2.3 Uso de marcadores moleculares na diversidade genética de jenipapeiro

Para a conservação da variabilidade genética de uma população, há a necessidade de compreensão dos fatores como a fragmentação florestal e fluxo de gênico das espécies. A desintegração pode ser resultado de danos causados pelas atividades humanas, mantendo população naturais restritas a pequenos fragmentos florestais ou parques protegidos, como é o caso de remanescentes de jenipapeiro (MANOEL et al., 2014).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados tanto em programas de conservação quanto em pré-melhoramento de frutíferas nativas. O índice de Shannon é uma das variáveis mais estudadas para aferir níveis de diversidade, sendo que quanto menor o seu valor, a diversidade da amostra é baixa, e tende a ser mais alta quando maior o valor do índice que varia de 0 a 1 (URAMOTO et al., 2005). Em estudos com populações naturais de jenipapeiro, Silva et al. (2015) encontraram índices de diversidade de Shannon de 0,42 e similaridade entre os indivíduos variando de 0,22 a 0,75. Esses dados indicam uma diversidade relativamente alta entre os indivíduos e os resultados poderão ser utilizados em futuros programas de reprodução e conservação da espécie.

Uma vez que os recursos genéticos de frutíferas nativas estão ameaçados pela progressiva destruição do seu habitat, torna-se necessário uma técnica eficiente para a obtenção de informações sobre a distribuição da variação genética dentro e entre populações (ZUCCHI, 2002).

Ensaio com isoenzimas feitas por Sebben (2004) demonstraram que tais marcadores bioquímicos podem ser usados em avaliações do sistema de reprodução e análise de paternidade de jenipapeiro.

Marcadores genéticos também são utilizados em estudos de caracterização de ecossistemas florestais permitindo avanços no entendimento das populações naturais. Dessa forma, Utilizando RAPD, Rabbani et al., (2012) concluíram que os indivíduos estudados podem ser utilizados como matrizes fornecedoras de sementes em programas de restauração de áreas degradadas.

Marcadores microssatélites para jenipapeiro foram desenvolvidos por Manoel et al., (2014) e investigando herança mendeliana, ligação genética e desequilíbrio genotópico, Manoel et al., (2015) genotiparam árvores adultas advindas de áreas fragmentadas, regenerantes e sementes oriundas de polinização aberta e encontraram uma ligação genética significativa entre locos emparelhados.

Em estudos com Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapeiro, Silva et al., (2014) utilizaram 12 iniciadores ISSR de forma eficiente identificando grupos que podem ser usados na reclassificação dos acessos, contribuindo para futuros programas de melhoramento.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, H.F.; REIS, R.G.E.; TEÓFILO, E.M. Morphological characterization of fruits, seeds, seedlings and germination of *Mucuma aterrima* Piper & Tracy. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 563-569, 2009.

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

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993, 341 p.

ALVES, K. S. **Análise da aceitabilidade de preparações com frutos do Cerrado**: Barú e Jenipapo. Faculdade de Ciências da Educação e Saúde. Brasília, 2011.

AMARAL, C.N.; GUARIM NETO, G. Os quintais como espaços de conservação e cultivo de alimentos: um estudo na cidade de Rosário Oeste (Mato Grosso, Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 3, n. 3, p. 329-341, 2008.

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

ANDRADE, S.A.C.; METRI, J.C.; BARROS NETO, B.; GUERRA, N.B. Desidratação osmótica do Jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 276-281, 2003.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

AZOFEIFA-DELGADO, A. Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía mesoamericana**, v. 17, n. 2, p. 221-242, 2006.

BALLAL, S.R.; FORÉ, S.A.; GUITTMEN, S.I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.1311-1315, 1994.

BAUDET, L.M.L.; VILLELA, F.A.; CAVARIANI, C. Princípios de secagem. **Seed News**, n. 10, p. 20-27, 1999.

BENTES, A. S.; DE SOUZA, H. A. L.; AMAYA-FARFAN, J.; LOPES, A. S.; DE FARIA, L. J. G. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3919-3924, 2015.

BENTES, A.S.; MERCADANTE, A.Z. Influence of the Stage of Ripeness on the Composition of Iridoids and Phenolic Compounds in Genipap (*Genipa americana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10800–10808, 2014.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. Ed. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. 540p, 1976.

BRAUCH, J.E.; ZAPATA-PORRAS, S.P.; BUCHWEITZ, M.; ASCHOFF, J.K.; CARLE, R. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, parte 1, p. 391-398, 2016.

CARNEVALE, N.J.; MONTAGNINI, F. Facilitating regeneration of secondary forests with the use of mixed and pure plantations of indigenous tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 163, p. 217-22, 2002.

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

CARVALHO, P.C.L.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; CARVALHO, J.A.B.S. Conservação de germoplasma de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 277-281, 2002.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, Colombo, Brazil, p 640, 1994.

CARVALHO, P.E.R. **Jenipapeiro**. Colombo: Embrapa- CPATC, 2003. 14p. (Circular técnica 80).

CHEM J.; WU, H.; DAI, M.M.; LI, H.; CHEN, J.Y.; HU, S.L. Identification and distribution of four metabolites of geniposide in rats with adjuvant arthritis. **Fitoterapia**, v. 97, p. 111–121, 2014.

COELHO, M.F.B.; SOUZA FILHO, J.C.; AZEVEDO, R.A.B.; DOMBROSKI, J.L.D.; MAIA, S. S. S. Substrata effect on *Magonia pubescens* St. Hil. seed emergence. **Revista Brasileira de Ciencias Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 80-84, 2010

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

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A.S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.5, p.499-508, 2011.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 77, p. 91–98, 2001.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Rubiáceas**: Flora Ilustrada Catarinense. Santa Catarina: Ademir Reis, v.2, p. 353-360, 2005.

DELPRETE, P.G.; JARDIM, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: overview about the current status and challenges. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 101-128, 2012.

DEUS, C.E.; WEIGAND JUNIOR, R.; KAGEYAMA, P.Y.; VIANA, V.M.; FERRAZ, P. de A.; BORGES, H.B.N.; ALMEIDA, M.C.; SILVEIRA, M.; VICENTE, C.A.R.

Comportamento de 28 espécies arbóreas tropicais sob diferentes regimes de luz em Rio Branco, Acre. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 1993. 170p

DIAS, F.T.C.; BERTINI, C.H.C.M.; DA SILVA, A.P.M.; CAVALCANTI, J.J.V. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 563-572, 2015.

DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. R. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 278p.

ERBANO, M.; DUARTE, M.R. Morfoanatomia de folha e caule de *Genipa americana* L., Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, 2010.

FERNANDES, A.F.; RODRIGUES, S. Ultrasound as Pre-Treatment for Drying of Genipap (*Genipa americana* L.). **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, 2012.

FERREIRA, W. R.; RANAL, M.; DORNELES, M. C.; SANTANA. Crescimento de mudas de *Genipa americana* L. submetidas a condições de pré-semeadura. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1026-1028, 2007. Suplemento 2.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidante signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

GAO, L.N.; ZHANG, Y.; CUI, Y.L.; YAN, K. Evaluation of genipin on human cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein in vitro. **Fitoterapia**, v. 98, p. 130–136, 2014.

GARCIA, D.C; BARROS, A.C.S.A.; PESKE, S.T.; MENEZES, N.L. A secagem de sementes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.603-608, 2004.

GOMES, M. *Genipa in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14045>>. Acesso em: 20 Mai. 2019

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J. AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GREGGAINS, V. FINCH-SAVAGE, W.E.; ATHERTON, N.M.; BERJAK, P. Perda de viabilidade e processos de radicais livres durante a dessecação desementes recalcitrantes de *Avicennia marina*. **Seed Science Research**, v. 11, n. 3, p. 235-242, 2001.

KHAN, M.A.; WEBER, D.J. **Ecophysiology of hight salinity tolerant plants (tasks for vegetation science)**, 1 ed. Amsterdã, Netherlands: Springer, 2008. 399p.

KLEIN, M.P.; HACKENHAAR, C.R.; LORENZONI, A.S.G.; RODRIGUES, R.C; COSTA, T.M.H.; NINOW, J.L; HERTZ, P.F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymer**, v. 137, p. 184–190, 2016.

LEE, C.H.; KWAK, S.C.; KIM, J.Y.; MEE OH, H.; CHUAL RHO, M.; YOON, K.H.; YOO, W.H.; LEE, M.S.; OH, J. Genipin Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Differentiation Through

- Proteasome-Mediated Degradation of c-Fos Protein and Suppression of NF- κ B Activation. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 124, n. 3, p. 344–353, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992.
- MAGISTRALI, P.R.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J.M.R.; GASPA, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.
- MANOEL, R.O.; FREITAS, M.L.M.; TAMBURASSI, E.V.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T.; SEBBEN, A.M. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at microsatellite loci in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8161-8169, 2015.
- MANOEL, R.O.; FREITAS, M.L.M.; BARRETO, M.A.; MORAES, M.L.T.; SOUZA, A.P.; SEBBEN, A.M. Development and characterization of 32 Microsatellite loci in *Genipa americana* (Rubiaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 3, 2014.
- MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 12, p. 660-666, 2013.
- MESQUITA, J.B.; SANTOS, M.J.C.; RIBEIRO, G.T.; MOURA, A.O. The composition evaluation of substrata and containers in the production of jenipapo seedlings (*Genipa americana* L.). **Natural Resources**, v. 1, p. 37-45, 2011.
- MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.A.F.; GOMES, F.P.; AGUILAR, A.G.; MANGABEIRA, P.A.O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, p. 221-231, 2003.
- 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.
- MONTEIRO, J.G; CRUZ, F.J.R.; NARDIN, M.B.; DOS SANTOS, D.M.M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 18-25, 2014.
- MORAES, L.A.C., GARCIA, T.B., SOUSA, N.R., & MOREIRA, A. Induction of apical bud sprouting in seedlings and rooting of cuttings of mangosteen. **Acta Scientiarum Agronomy**, 29, p. 665-669, 2007.
- MOURA, R.S. **Diversidade genética e germinação de jenipapo**. 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2014.
- MUNNS, R.; GILLIHAN, M. Salinity tolerance of crops—what is the cost? **New Phytologist**, v. 208, p. 668–673, 2015.
- MUZZARELLI, R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 1–9, 2009.
- NASCIMENTO, C.M. **Criopreservação e sementes sintéticas de jenipapeiro**. 2018. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2018.

NÁTHIA-NEVES, G.; NOGUEIRA, G.C.; VARDANEGA, R.; MEIRELES, M.A.A. Identification and quantification of genipin and geniposide from *Genipa americana* L. by HPLC-DAD using a fused-core column. **Food Science and Technology**, v. 38, 2018. Suplemento 01.

NERI-NUMA, I.A.; PESSOA, M.G.; PAULINO, B.N.; PASTORE, G.M. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271-279, 2017.

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

OLIVEIRA, A.C.A.; MACHADO, C.A.; OLIVEIRA, L.A.R.; SILVA, A.V.S.; LEDO, A.S. In vitro morphogenic response from zygotic embryos of *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, 2017.

OLIVEIRA, L.D.R.; MIRANDA, J.P.H.V.; CURADO, G.S.; COSTA NETO, J.P.; SANTOS, B.F.; BARROS, E.E.L.; LOUVANDINI, H.; MELO, F.R. *Haemonchus contortus*: in vivo anthelmintic activity of *Genipa Americana* L. leaves in sheep. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, 2012.

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**, v. 32, n. 2, p. 495-502, 2011.

OMENA, C.M.B.; VALENTIM, I.B.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; MANO, C.M.; BECHARA, E.J.H.; SAWAYA, A.C.H.F.; TREVISAN, M.T.S.; COSTA, J.G.; FERREIRA, R.C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, p. 334–344, 2012.

OSIPI, E.A.F.; LIMA, C.B.; COSSA, C.A. Influence of methods of aryl remotion on physiology and quality of *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 33, p. 680-685, 2011.

PATADE, V.Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought tolerance of sugarcane under iso-osmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidante defense. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, p. 275-282, 2011.

PHILLIPS, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. Marcadores de ADN: **Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*)**. Serie técnica. Informe técnico 252. CATIE. Turrialba: Costa Rica, 1995, 183 p.

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.

QUEIROZ, S.E.E.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C.; JOSÉ, A.C.; SILVA, A.T.; FRAIZ, A.C.R.; FARIA, J.M.R.; HILHORST, H.W.M. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. **Physiologia Plantarum**, v. 144, p. 263–276, 2012.

RABBANI, A.R.C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R.A. Variabilidade genética de *Genipa americana* L. pertencente ao baixo curso do Rio São Francisco. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 401-409, 2012.

RAO, R. V.; HODGKIM, T. Genetic diversity and conservation and utilization of genetic resources. **Plant Cell**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2002.

RENHE, I.R.T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.)**. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

RENHE, I.R.T.; STRIGHETA, P.C.; SILVA, F.F.; OLIVEIRA, T.V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n.6, 2009.

SA, F.P.; LEDO, A.S.; AMORIM, J.A.E.; SILVA, A.V.C.; PASQUAL, M. In vitro propagation and acclimatization of jenipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 2, p. 155-163, 2016.

SANTANA, K.B.; ALMEIDA, A.F.; SOUZA, V.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C.; GOMES, F.P.; DUTRUCH, L.; LOGUERCIO, L.L. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, p. 35– 42, 2012.

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

SEBBENN, A. M. Herança e ligação em locos de isoenzimas em *Genipa americana* L. **Revista Instituto Florestal**, v.16, n.1, p.65-72, 2004.

SEMEDO, R.J.C.G.; BARBOSA, R.I. Árvores frutíferas nos quintais urbanos de Boa Vista, Roraima, Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 497-504, 2007.

SIGURDSON, G.T.; TANG, P.; GIUSTI, M.M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 261–280, 2017.

SILVA, A.V.C.; MUNIZ, E.N.; ALMEIDA, C.S.; VITÓRIA, M.F.; LEDO, A.S.; MELO, M.F.V.; RABBANI, A.R.C. Genetic diversity and sex identification in *Genipa americana* L. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 18, p. 81-86, 2015.

SILVA, A.V.C.; MUNIZ, E.N.; YAGUIU, P.; Silva, C.A.; CARNELOSSI, M.A.G.; NARAIN, N. Uso de embalagem e refrigeração no armazenamento de jenipapo. **Proceedings of the Tropical Region - American Society for Horticultural Science**, v. 52, p. 173-176, 2008.

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

SILVA, A.V.C.; SOARES, A.N.R.; CARDOSO, M.N.; MELO, M.F.V.; MUNIZ, E.N.; LEDO, A.S. Evaluation of substrates for jenipapo (*Genipa americana* L.) seedlings production. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 2, 2018.

SILVA, E.F.; ARAÚJO, R.L.; MARTINS, C.S.R.; MARTINS, L.S.; VEASEY, E.A. Diversity and genetic structure of natural populations of araçá (*Psidium guineense* Sw.). **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 37–44, 2016.

SOARES, A.C.F.; SOUZA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 2012.

SOARES, A.N.R.; VITÓRIA, M.F.; NASCIMENTO, A.L.S.; LEDO, A.S. RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2016.

SOUZA V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia Ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado na APG III. 3. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 428-434, 2012.

SOUZA, A.F.; ANDRADE, A.C.S.; RAMOS, F.N.; LOUREIRO, M.B. Ecophysiology and morphology of seed germination of the neotropical lowland tree *Genipa americana* (Rubiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, v.15, n. 667–680, 1999.

SOUZA, R.O.S.; SOUZA, P.L.; MENEZES, R.R.P.P.; SAMPAIO, T.L.; TESSAROLO, L.D.; SILVA, F.C.O.; PEREIRA, M.G.; MARTINS, A.M.C. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 311–317, 2018.

SOUZA, V.L.; ALMEID, A.F.; LIMA, S.G.C.; CASCARDO, J.C.M.; SILVA, D.C.; MANGABEIRA, P.A.O.; GOMES, F.P. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Biometals**, v. 24, p. 59–71, 2011.

STRUWE, L. Gentianales (Coffees, Dogbanes, Gentians and Milkweeds). **Encyclopedia of life sciences**. Macmillan publishers. Nature publishing group; 2002. Disponível em: <http://gentian.rutgers.edu/reffiles/Struwe%202002%20ELS%20Gentianales.pdf>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAKATA, W; SILVA, E.G.; CRSATO, J.M.; FERREIRA, G. Germinação de sementes de romãzeiras (*Punica granatum* L.) de acordo com a concentração de giberelina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 254-260, 2014.

THIAM, A.R., FARESE, R.V., JR., AND WALTHER, T.C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 775–786, 2013.

URAMOTO, K.; WALDER, J.M.M.; ZUCCHI, R.A. Análise Quantitativa e Distribuição de Populações de Espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, 2005.

VALERI, S.V.; PUERTA, R.; CRUZ, M.C.P. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Florestalis**, v. 64, n. 1, p. 69-77, 2003.

WANG, H.Z.; WU, Z.X.; LU, J.J.; SHI, N.N.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.T.; LIU, J.J. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genetica**, v. 136, p. 391–399, 2009.

WOLKERS, W. F.; BOCHICCHIO, A.; SELVAGGI, G.; HOEKSTRA, F.A. Fourier transform infrared microscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant Physiology**, v. 116, n. 3, p. 1169-1177, 1998.

YOUNG, A.; BOYLE, T. **Forest Fragmentation**. In: Forest Conservation genetics: principles and practice. (A. Young, D. Boshier e T. Boyle, eds) CSIRO Publishing, Collingwood, p. 123-132, 2000.

ZAPPI, D. **Genipa in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14044>>.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 103f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2002.

4. ARTIGO 1: Diversidade genética em populações nativas de *Genipa americana* (Rubiaceae)

Publicado em: Genetic and Molecular Research, v. 18, n. 1, 2019.

RESUMO

O jenipapo (*Genipa americana* - Rubiaceae) é originário da América Tropical, ocorrendo no Brasil em praticamente todos os biomas, exceto nos Pampas. Tem importância socioeconômica principalmente devido ao uso dos frutos na fabricação de doces e sucos, além das propriedades medicinais de suas folhas. Avaliamos a diversidade genética de 73 indivíduos de 15 populações naturais no estado de Sergipe usando marcadores ISSR. A escolha das áreas foi feita aleatoriamente e o material genético foi extraído de folhas jovens. A análise de PCR utilizando nove marcadores gerou 113 bandas polimórficas, cujos fragmentos foram utilizados para estimar a diversidade genética. O índice de Shanon foi de 0,36 e a similaridade dos indivíduos variou entre 0,11 e 0,81. Os indivíduos Salgado 3 (SAL3) e Salgado 4 (SAL4) foram os mais similares (0,81) e 7 pares apresentaram menor similaridade (0,11). A distância genética permitiu a análise da UPGMA, que divide os indivíduos em dois grupos distintos. O nível de confiabilidade genética obtido por este trabalho permite a diferenciação entre genótipos que podem ser usados para enriquecer o Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo e as informações geradas serão úteis na conservação desses recursos genéticos e em futuros programas de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Jenipapo; ISSR; Recursos Genéticos Vegetais; Populações.

ABSTRACT

Título: Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae) populations

Genipap (*Genipa americana* - Rubiaceae) originates in Tropical America, occurring in Brazil in practically all biomes, except in the Pampas. It has a socioeconomic importance mainly due to the use of fruits in the manufacture of sweets and juices besides the medicinal properties of its leaves. We evaluated the genetic diversity of 73 individuals from 15 natural populations in the state of Sergipe using ISSR markers. The choice of areas was made randomly and the genetic material was extracted from young leaves. PCR analysis using nine markers generated 113 polymorphic, whose fragments were used to estimate genetic diversity. The Shannon index was 0.36 and the similarity of individuals varied between 0.11 and 0.81. The individuals Salgado 3 (SAL3) and Salgado 4 (SAL4) were the most similar (0.81) and 7 pairs had less similarity (0.11). The genetic distance allowed the analysis of the UPGMA, which it divides individuals in two distinct groups. The level of genetic reliability obtained by this work allows the differentiation between genotypes that can be used to enrich the Genipap Active Bank and the information generated will be useful in the conservation of these genetic resources and in future breeding programs of the species.

Key-words: Genipap; ISSR; Plant Genetic Resources; Populations.

4.1. INTRODUÇÃO

Jenipapeiro (*Genipa americana* L.), também conhecido no Brasil como jenipapo, janapabeiro e janipaba, é uma espécie nativa cultivada na América tropical, estendendo-se do México à Argentina (Delprete et al., 2005). Ocorre em quase todos os biomas brasileiros, com exceção dos Pampas, sendo encontrados em diversas formações florestais localizadas em várzeas úmidas ou úmidas (Lorenzi, 2008). Pertence à família Rubiaceae, com distribuição cosmopolita concentrada nos trópicos, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9.000 espécies. No Brasil, existem cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies, correspondendo à família mais populosa do bioma Cerrado e um elemento importante em quase todas as formações naturais (Souza & Lorenzi, 2012).

As árvores desta espécie são, funcionalmente, monóica e dióica perenes, com reprodução preferencialmente por cruzamentos (Sebbenn et al., 1998). É uma espécie alogâmica, permitindo grande flexibilidade da estruturação genética, o que permite melhor adaptação das plantas a mudanças de longo alcance no ambiente (Allard, 1971), gerando variabilidade dentro das populações.

Na medicina popular, folhas, cascas, frutos e raízes são empregados, geralmente na forma de chás com fins medicinais, alimentícios, tinturas e ornamentais (Souza et al., 2013). O que fornece a potencialidade de uso da espécie é sua composição química, composta principalmente de iridóides, como genipina e geniposídeo (Alves et al., 2017), esteróides (Conceição et al., 2011), ácidos graxos (Costa et al., 2011) e taninos (Moura et al., 2016).

As folhas possuem propriedades anticonvulsivas (Nonato et al., 2018), antimaláricas (Deharo et al., 2001) e tripanocidas (Souza et al., 2018). Extratos fenólicos de frutas têm a capacidade de inibir a proliferação de células responsáveis pelo hepatocarcinoma humano (Finco & Groeve, 2013). O pigmento azul extraído de frutos verdes é uma alternativa promissora para aplicações industriais em produtos alimentícios devido à similaridade com corantes comerciais (Sigurdson et al., 2017), proporcionando coloração de tecidos, substituição de ninidrina na identificação cromatográfica de aminoácidos e como corante para análise colorimétrica e fluorimétrica (Tokareva et al., 2017). O uso desta espécie também tem sido

recomendado para a recuperação de áreas degradadas devido à sua capacidade adaptativa quando sob condições adversas, como inundações no solo (Barbosa et al., 2007). Sua importância cria uma necessidade de conservação das espécies.

A erosão genética ocorre como consequência da fragmentação florestal, resultante de fatores como a urbanização, resultando na redução e isolamento da vegetação natural, reduzindo a variabilidade intra e interpopulacional (Young & Boyle, 2000). A fixação ou perda do alelo ocorre em populações pequenas que podem sobreviver com poucas cópias de certos alelos, aumentando a probabilidade de perda devido a eventos aleatórios. Consequentemente, os alelos desaparecem com o tempo, tornando a população menos diversificada geneticamente (Bartlewicz et al., 2015).

Nesse sentido, estudos envolvendo diversidade e estrutura genética das populações remanescentes são importantes para que estratégias de conservação possam ser planejadas. Para avaliar a variabilidade genética, marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) têm sido utilizados para estimar a diversidade genética, com base na técnica de PCR, com alta taxa de polimorfismo, reprodutibilidade e amplamente utilizados em genética populacional (Wakte et al. 2012).

Estudos com marcadores moleculares na estimação da diversidade genética em frutíferas também têm sido utilizados em mangaba (Soares et al., 2016); mulungú (Gonçalves et al., 2014) e cambui (Santana et al., 2016), fundamentais na geração de dados que podem ser utilizados em programas de melhoramento e criação de estratégias de conservação, como o Banco de Germoplasma (BAG), que é uma maneira de combinar a conservação de espécies agrônômicas com o desenvolvimento sustentável (Nass, 2007).

Com o intuito de preservar os recursos genéticos do jenipapo, o Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, foi implantado em 2009, na cidade de Nossa Senhora das Dores, estado de Sergipe. Atualmente, é constituído por 24 acessos de diferentes estados da federação e realiza atividades de prospecção, coleta, enriquecimento e conservação *ex situ*. O primeiro estudo sobre diversidade genética nesse germoplasma foi realizado por Silva et al. (2014) usando os primeiros 18 acessos.

O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética de populações naturais de *Genipa americana* L. para enriquecimento do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros e elaboração de estratégias de conservação para esses recursos genéticos.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostragem, coleta e extração de DNA

Folhas jovens foram coletadas de 15 populações naturais no Estado de Sergipe, totalizando 73 indivíduos (Figura 1). A expedição de coleta ocorreu em outubro de 2016 e a escolha das áreas foi aleatória.

As folhas de cada indivíduo foram coletadas, separadamente, acondicionadas em gelo, para evitar a oxidação e, em seguida, transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE. As amostras permaneceram em freezer -80°C até o momento da extração do DNA genômico, que foi realizada com base no método descrito por Doyle e Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria, utilizando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). As amostras foram diluídas em TE (Tris EDTA) a uma concentração de 10 ng.µL⁻¹ com volume final de 50µL por amostra. Logo após, foram armazenadas -20°C para subsequente uso nas reações de PCR.

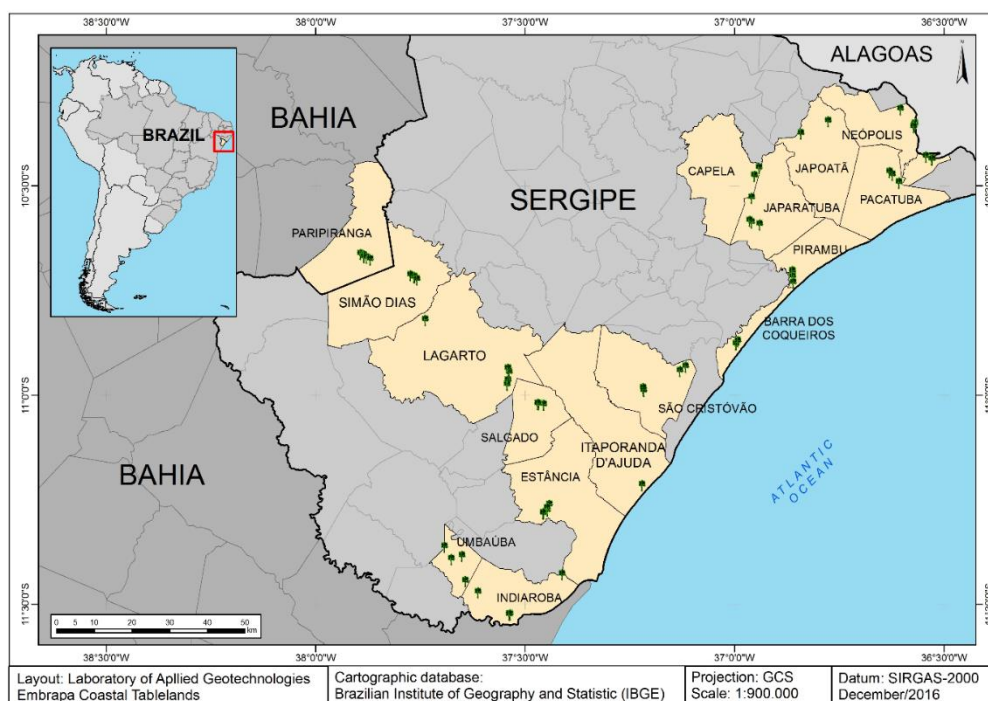


Figura 1. Abrangência da coleta de acessos de *Genipa americana* L. para avaliação da diversidade genética.

4.2.2 Amplificação por PCR

Para os ensaios de PCR, o volume total da reação foi de 20 μ L contendo: 1 μ L da solução de DNA genômico (10 ng. μ L⁻¹), 1 μ L de cada iniciador (10 μ M), juntamente com um mix composto de 2 μ L de tampão PCR 10X; 0,4 μ L de Dntp (10 mM); 0,6 μ L de MgCl₂ (50 mM); 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) Ludwig e 14,8 μ L de água ultrapura. Para amplificação das reações o termociclador Axygen Maxygene foi programado de forma, que as amostras fossem desnaturadas a 95°C por cinco minutos, seguida por 45 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia a desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a diferentes temperaturas por um minuto, uma primeira extensão a 72°C por 0,45 segundos, e finalmente, uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

O resultado da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal, em gel de agarose a 2% em tensão constante de 182V, 91 mA e 17 W por 115 min. Em seguida, os géis foram imersos em uma solução contendo brometo de etídio (0,5 μ L.mL⁻¹ de água), por 1 hora, e visualizados sob luz ultravioleta. Para a mensuração do padrão dos fragmentos, foi utilizado 5 μ L do marcador de peso molecular 100 pb, (Promega, Madison, South Dakota, EUA). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodocumentação Gel doc L-pix (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP).

4.2.3 Análise dos dados

Os fragmentos de ISSR foram convertidos em uma matriz binária, com base na presença (1) ou ausência (0) do fragmento. O coeficiente de Jaccard utilizado para estimar a distância genética e o dendrograma usando o grupo de pares não ponderado com o algoritmo de cluster da média aritmética (UPGMA) foram estimados pelo programa TreeView (Page, 1996). Para determinar a robustez do dendrograma, os dados foram iniciados com 10.000 repetições usando o software FreeTree (Pavlicek et al., 1999).

Para determinação do número ideal de fragmentos amplificados necessários ao estudo de diversidade genética nas populações naturais foi estimado o valor de correlação (r) dos valores da matriz de similaridade e estresse (E). De acordo com Oliveira et al., (2017) esses valores indicam o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada. O número ótimo de fragmentos foi

calculado pelo software GENES (Cruz, 2007) e satisfatório quando o valor de estresse foi inferior a 0,05 (Kruskal, 1964) e a correlação o mais próximo de 1.

Estimou-se a distribuição da variabilidade genética em cada população e em cada região, tendo por base as variáveis: índice de Shannon (I), heterozigosidade esperada (He), número de alelos esperados (Na), número de alelos efetivos (Ne) e método de análise de coordenadas principais (PCoA), com base nos coeficientes de similaridade do Jaccard, pelo software Genalex versão 6.5.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 113 fragmentos, todos polimórficos foram gerados a partir de nove marcadores ISSR utilizados para estimar diversidade genética das populações naturais (Tabela 1). O número de fragmentos variou de cinco (HB9) a vinte (17898 B) com média de 12,5 fragmentos por iniciador.

Vários estudos utilizando marcadores ISSR obtiveram altas taxas de polimorfismos, permitindo a avaliação da divergência genética. Em uma população natural de cambuzeiro, Santana et al. (2016) encontrou 71 bandas usando 10 marcadores. Avaliando a diversidade genética em *Capparis* (Capparaceae) em diferentes distribuições geográficas, Tamboli et al. (2018) obtiveram 97 loci utilizando quatro marcadores. Jimenez et al. (2015) caracterizou a diversidade genética de indivíduos de populações naturais de mangabeira (*Harconia speciosa* Gomes) a partir de seis marcadores e que resultaram em 83 bandas polimórficas.

Tabela 1. Marcadores ISSR utilizados em populações naturais de *G. americana* L. do Estado de Sergipe, Brasil, com suas respectivas sequências, temperaturas de anelamento (Ta), total de fragmentos (TF), fragmentos polimórficos (FP) e porcentagem de polimorfismo (PPF).

Iniciadores ISSR	Sequências 5' → 3'	Temperatura de anelamento (Ta)	Total de Fragmentos (TF)	Fragmentos polimórficos (FP)	PPF (%)
17898 B	CACACACACACAGT	49,7	20	20	100
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	47,0	14	14	100
HB9	GTGTGTGTGTGTGG	52,6	5	5	100
HB10	GAGAGAGAGAGACC	52,6	10	10	100
HB11	GTGTGTGTGTGTCC	52,6	8	8	100
HB13	GAGGAGGAGGC	49,3	10	10	100
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	46,8	11	11	100
ISSR 13	ACACACACACACACGA	48,0	16	16	100
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	58,8	19	19	100
Média total			12,55	12,55	100

A demonstração de eficiência no número de marcadores ISSR utilizados na diversidade de *Genipa americana* foi obtida a partir de 111 fragmentos polimórficos, onde a estimativa de correlação (r) foi de 0,996 e o valor de estresse foi de 0,0346 (Figura 2). Valores de estresse menores ou iguais a 0,05 indicam que as estimativas são precisas (Kruskal, 1964).

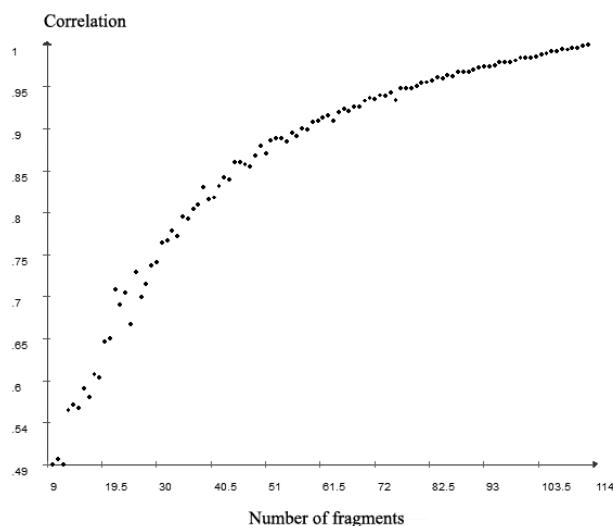


Figura 2. Coeficiente de correlação e número de fragmentos obtidos a partir do uso de nove marcadores ISSR na diversidade genética de populações naturais *G. americana* L. obtidos pelo método de *bootstrap*.

O número de bandas polimórficas é considerado ótimo quando o coeficiente de variação é menor que 1%. Houve uma relação inversamente proporcional entre o número de fragmentos analisados e a variância (Figura 3). Com a análise utilizando o software DBOOT, observou-se que quando 110 fragmentos 100% polimórficos foram gerados houve uma estabilização do coeficiente de variação (<0,01%). A quantificação do número mínimo de marcadores fornece dados que otimiza o uso dos recursos e tempo, resultando em um menor número de marcadores representativos da amostragem do genoma para caracterização da diversidade genética (Gonçalves et al., 2014).

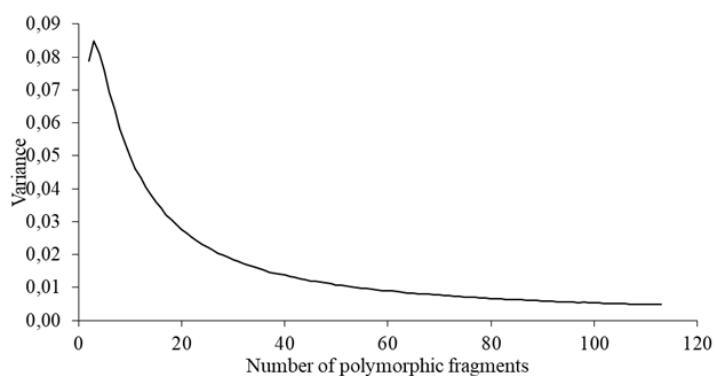


Figura 3. Variância de fragmentos polimórficos usando marcadores ISSR entre 73 genótipos de *G. americana* L.

Estudos sobre *G. americana* ainda são recentes. Para avaliar os acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Silva et al. (2014) utilizaram 12 marcadores ISSR e obtiveram 100% de polimorfismo percentual. Rabbani et al. (2012) utilizaram 12 marcadores RAPD para estimar a variabilidade genética entre indivíduos na região do Baixo São Francisco de Sergipe e encontraram 74% de polimorfismo. Tais resultados indicam que os marcadores moleculares são eficientes na observação da heterogeneidade entre as populações. O índice de diversidade Nei (H_e), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi de 0,22. O índice de alelos observado (N_a) foi de 1,98, os alelos efetivos (N_e) de 1,34 e o índice de Shannon (I) de 0,36. Esses valores revelam níveis intermediários de diversidade genética entre as populações, fato relacionado à proximidade geográfica entre as matrizes em que o material

vegetal foi coletado. Em condições naturais, o valor de H nunca é zero, pois há incorporação de novos alelos através de cruzamentos, bem como perdas devido à deriva genética (Silva et al., 2014).

Os marcadores ISSR tem demonstrado eficácia em estudos com várias famílias, dentre eles, diversidade genética na família Rubiácea (Gaafar et al., 2014; Mishra et al., 2011; Neuba et al., 2014; Rossi et al., 2009). Em Apocynaceae, a exemplo da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), Soares et al., (2016) observaram diversidade de 0,12 em populações naturais de Sergipe. Na espécie medicinal *Myrcia lundiana*, da família Myrtaceae, foi observado índice de diversidade moderado de 0,15 em uma população nativa (Alves et al., 2016).

Baseado em marcadores ISSR, a matriz de similaridade apresentou valores que variaram de 0,11 a 0,81 (Tabela 2) com média geral de 0,33. O par formado pelos indivíduos Salgado 3 (SAL3) e Salgado 4 (SAL4) foram os mais semelhantes geneticamente, com valor de 0,81. Por outro lado, os pares Estância 3 (EST3) e Pirambu 4 (PIR4), Estância 3 (EST3) e Pirambu 5 (PIR5), Estância 4 (EST4) e Japarutuba 1 (JAT1), Estância 3 (EST3) e Japarutuba 1 (JAT1), Estância 4 (EST4) e Pirambu 2 (PIR2), Salgado 2 (SAL2) e Barra dos Coqueiros 2 (BC2), Lagarto 5 (LAG5) e Pirambu 5 (PIR5) obtiveram os menores valores (0,11), indicando uma maior diferenciação entre os indivíduos.

Tabela 2. Pares de genótipos com maiores e menores valores de similaridade (S) baseados no Coeficiente de Jaccard, calculado a partir de nove marcadores em 73 indivíduos de *Genipa americana* L.

Ordem	Maior similaridade	S	Menor similaridade	S
1	Salgado 3 x Salgado 4	0,81	Estância 3 x Pirambu 4	0,11
2	Salgado 3 x Salgado 7	0,80	Estância 3 x Pirambu 5	0,11
3	Pirambú 1 x Barra dos Coqueiros 3	0,75	Estância 4 x Japarutuba 1	0,11
4	Capela 1 x Pacatuba 4	0,74	Estância 3 x Japarutuba 1	0,11
5	Barra dos Coqueiros 4 x Barra dos Coqueiros 2	0,73	Estância 4 x Pirambu 2	0,11
6	Salgado 4 x Salgado 6	0,72	Salgado 2 x Barra dos Coqueiros 2	0,11
7	Lagarto 4 x Lagarto 3	0,72	Lagarto 5 x Pirambu 5	0,11

Os cruzamentos influenciam os níveis de variabilidade genética, porque reduzem a distância e aumentam a divergência entre alguns genótipos (Silva et al., 2017). A ocorrência de heterogeneidade entre os indivíduos estudados usando marcadores ISSR sugere a eficácia desta técnica para estudos de diversidade genética (Santana et al., 2016).

A distância genética entre 73 indivíduos de diferentes localidades foi utilizada para construir o dendrograma utilizando o método UPGMA (Figura 4). Baseado no coeficiente de Jaccard dois grupos foram identificados. Por isto, o maior grupo formado foi o C1, com 37 indivíduos. O par SAL3 e SAL4 (0,81) foi o de indivíduos mais próximos, encontrados no grupo C2, composto por 36 indivíduos. Os pares de maior diversidade (0,11) são formados por indivíduos pertencentes aos dois grupos. A alta variabilidade observada nos grupos pode ser explicada pela preferência por alogamia de espécies ainda não domesticadas (Oliveira et al., 2009). Os subgrupos formados sugerem a diferenciação entre acessos divergentes com ancestral comum, fato que pode ocorrer pelo distanciamento geográfico das matrizes (Silva et al., 2014).

A consistência nos dados sobre similaridade genética é importante para o estabelecimento de uma coleção *ex situ* ou de uma troca de germoplasma, uma vez que, nesses casos, apenas um indivíduo seria selecionado (Santana et al., 2016). Sendo assim, tais informações podem ser utilizadas para o enriquecimento do BAG Jenipapo.

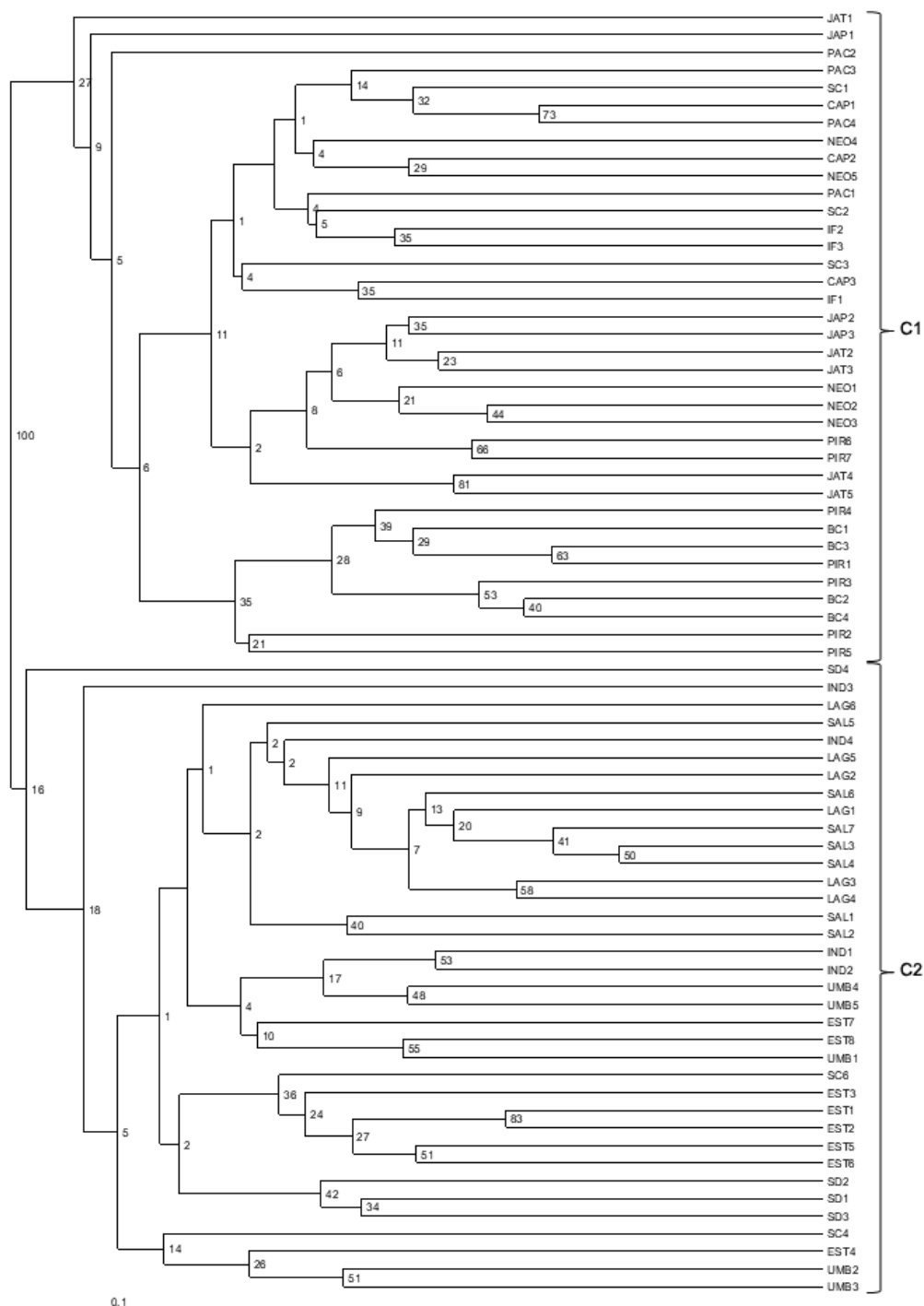


Figura 4. Representação filogenética do Método do Grupo de Pares Não Ponderados usando o agrupamento de médias aritméticas (UPGMA) estimado pela similaridade genética do coeficiente de Jaccard, pela análise de bootstrap (10 000x) e grupos (C1 e C2) de 73 indivíduos de *G. americana* L.

As distâncias genéticas também foram utilizadas na Análise de Componentes Principais (PcoA). Dois agrupamentos foram identificados e a soma das duas primeiras coordenadas do

gráfico gerado explicaram 58% da variabilidade (Figura 5). Esses resultados reforçam a eficiência no estudo de diversidade genética utilizando marcadores ISSR.

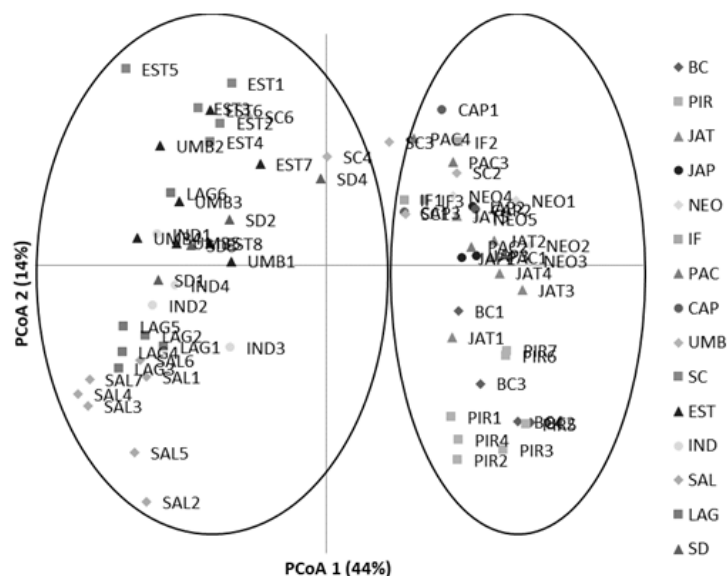


Figura 5. Análise de Componente Principal (PcoA) de populações naturais de *G. americana* L. do estado de Sergipe, Brasil.

O emprego de mais de um método de agrupamento, em função de hierarquização, otimização e ordenação dos grupos permite uma classificação mais concisa, pois emprega os critérios para cada técnica utilizada, impedindo inferências errôneas sobre a classificação do material dentro de determinado subgrupo de genótipos (Silva et al., 2012).

4.4. CONCLUSÕES

Há diversidade genética intermediária em populações naturais de *G. americana* no estado de Sergipe. O nível de confiabilidade genética obtido por meio de análises via ISSR permite a diferenciação entre genótipos que podem ser usados para enriquecer o Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo e, entre os espécimes avaliados, os indivíduos EST3, PIR4, PIR5, EST4, JAT1, PIR2, SAL2, BC2 e LAG5 são recomendados porque são geneticamente mais distantes.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard RW (1971). *Princípios do melhoramento genético das plantas*. Blumenschein A, Paterniani E, Gurgel JTA, Vencovsky R. (Tradutores). São Paulo: USAID - Edgard Blücher, 381p.
- Alves JSF, Medeiros LA, Fernandes-Pedrosa MF, Araújo RM et al (2017). Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. *Rev. bras. farmacogn*, 27: 641–644.
- Alzate-Marin AL, Guidugli MC, Soriani HH, Martinez CA et al (2009). An Efficient and Rapid DNA Miniprepation Procedure Suitable for PCR/SSR and RAPD Analyses in Tropical Forest Tree Species. *Braz. Arch. of Biol. and Technol.* 5: 1217-1224.
- Barbosa RMT, Almeida AAF, Mielke MS, Loguercio LL et al (2007). A physiological analysis of *Genipa americana* L.: a potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. *Environ Exp Bot.* 61: 264-271.

- Bartlewicz J, Vandepitte K, Jacquemyn H, Honnay O (2015). Population genetic diversity of the clonal self-incompatible herbaceous plant *Linaria vulgaris* along an urbanization gradient. *Biol. J. Linn. Soc.* 116: 603-613.
- Conceição AO, Rossi MH, Oliveira FF, Takser L et al (2011). Genipa americana (Rubiaceae) fruit extract affects mitogen-activated protein kinase cell pathways in human trophoblast-derived BeWo Cells: implications for placental development. *J Med Food.* 14: 483-494.
- Costa PA, Ballus CA, Filho JT, Godoy, HT (2011). Fatty acids profile of pulp and nuts of brazilian fruits. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 31: 950-954.
- Cruz, C. D (2007). *Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa, MG: UFV.
- Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Muñoz V et al (2001). Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol.* 77: 91-98.
- Delprete, PG, Smith, LB, Klein RM (2005). *Rubiáceas*. p. 345-842. In: Reitz, A.R., ed. Flora Catarinense. Parte II. Rubi. TBG, Itajaí.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue (1990). *Focus.* 12: 13-15.
- Gonçalves LO, Pinheiro JB, Zucchi MI, Silva-Mann R (2014). Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. *Ver. Cien Agro.* 45: 290-298.
- Finco FDBA, Graeve SBL (2013). Antiproliferative activity of Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) and Jenipapo (*Genipa americana* L.) phenolic extracts A comparison of assays. *Food Sci Nutr.* 43: 98-103.
- Jimenez HJ, Martins LSS, Montarroyos AVV, Silva Junior JF et al (2015). Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14 (4): 17749-17757.
- Kruskal JB (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika.* 29: 1-27.
- Lorenzi, H, Matos, FJA (2008). *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas*. 2ª Edição, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p.
- Moura SMS, Souza SRS, Conde Júnior AM (2016). *Genipa americana* L.: prospecção tecnológica. *Jorn. Int. Bioc.* 1: 31-35 (in Portuguese, with abstract in English).
- Nass, LL (2007). *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 858.
- Nonato DTT, Vasconcelos SMM, Mota MRL, Silva PGB et al (2018). The anticonvulsant effect of a polysaccharide-rich extract from *Genipa americana* leaves is mediated by GABA receptor. *Biomed. Pharmacother.* 101: 181-187.
- Oliveira LAR, Machado CA, Cardoso MN, Oliveira ACA et al (2017). Genetic diversity of Saccharum complex using ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 16: 1-10.
- Oliveira MG, Oliveira JG, Gomes Filho AG, Pereira MG, et al. (2009). Genetic diversity of barbados cherry (*Malpighia emarginata* D. C.), with RAPD molecular markers and morpho-agronomical characteristics. *Rev. Bras. Frutic.* 31: 162-170.
- Page RDM (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Applic. in the Biosc.* 12: 357-358.
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J. (1999) Free-Tree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 45: 97-99.
- Rabbani ARC, Silva-Mann R, Ferreira RA (2012). Variabilidade genética de *Genipa americana* L. pertencente ao baixo curso do rio São Francisco. *Rev. Árvore*, 36: 401-409 (in Portuguese, with abstract in English).

- Rossi AAB, Oliveira LO, Venturini BA, Silva RS (2009). Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetica*. 136: 57–67.
- Santana JGS, Nascimento ALS, Costa TS, Almeida TMB et al (2016). Estimation of genetic diversity in a natural population of cambui tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. *Gen. Mol. Res.* 15: 1-11.
- Sebbenn AM, Kageyama P, Vencovsky R (1998). Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética especial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. *Sci. For.* 53: 15-30.
- Sigurdson GT, Tang P, Giusti MM (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu Rev Food Sci Technol.* 8: 261–280.
- Silva AVC, Freire KCS, Ledo AS, Rabbani ARC (2014). Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa americana* L.) Brazilian accession. *Sci. Agric.* 71: 387-393.
- Silva AVC, Nascimento ALS, Vitória MF, Rabbani ARC et al (2017). Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Genet Mol Res.* 16: 1-9.
- Silva AVC, Santos ARF, Ledo AS, Feitosa RB et al (2012). Moringa genetic diversity from germplasm bank using RAPD markers. *Tropical e Subtropical. Agroecosystems* 15: 31-39.
- Soares ANR, Vitória MF, Nascimento ALS, Ledo AS et al (2016). Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. *Gen. Mol. Res.* 15: 1-11.
- Souza RKD, Mendonça ACAM, Silva MAP (2013). Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. *Rev Cub Plan Med.* 18: 140-156.
- Souza ROS, Souza PL, Menezes RRPP, Sampaio TL et al (2018). Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. *J Ethnopharmacol.* 210: 311–317.
- Souza VC, Lorenzi H (2012). Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado na APG III. 3. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 428-434.
- Tamboli AS, Yadav PB, Gothe AA, Yadav SR et al (2018). Molecular phylogeny and genetic diversity of genus *Capparis* (Capparaceae) based on plastid DNA sequences and ISSR markers. *Plant Syst Evol.* 304: 205–217.
- Tokareva MI, Ivantsova MN, Mironov MA (2017). Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking of proteins and polysaccharides. *Chem Heterocyclic Com+*. 53: 21–35.
- Wakte KV, Saini A, Jawali N, Thengane RJ et al (2012). Genetic diversity assessment in *Pandanus amaryllifolius* Roxb. populations of India. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 1583-1595.
- Young AG, Boyke TJ (2000). *Forest fragmentation*. In: Young A, Boshier D, Boyle T. Forest conservation genetics. Melbourne: CSIRO Publishing

5. ARTIGO 2: Qualidade fisiológica e tolerância de sementes de jenipapo submetidas à secagem.

Periódico submetido: Journal of Agricultural Science

RESUMO

O jenipapo (*Genipa americana* L.) é uma fruta nativa de ocorrência no norte da América do Sul até a Argentina. A árvore é utilizada em arborização urbana, possui características que auxiliam na restauração de áreas degradadas e seus frutos possuem importância econômica na fabricação de doces, vinhos e licores. A propagação da espécie ocorre por sementes, com germinação lenta e desuniforme. Então para compreender os processos de germinação em espécie sensíveis a dessecação, é importante fator na resolução de problemas de armazenamento. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da secagem na germinação e crescimento inicial de jenipapeiro. As sementes foram oriundas do município de Umbaúba/SE e, após o beneficiamento, foram submetidas aos diferentes períodos de secagem (0; 24; 48; 72; 96 e 120 horas) sob temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A semeadura ocorreu em sacos de polietileno contendo substrato e pó de coco lavado na proporção 2:1 (v/v). As variáveis avaliadas foram: teor de umidade, porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de plântulas, número de folhas, dimensões foliares, peso fresco e peso seco das plântulas. As sementes de jenipapeiro são intermediárias, perdendo a viabilidade à medida que o teor de umidade é reduzido; a viabilidade das sementes foi mantida em 80% no período de secagem de 48 horas, quando a umidade foi 32% e o crescimento inicial foi afetado após 96 horas de secagem.

Palavras-chave: *Genipa americana* L.; Secagem; Crescimento Inicial.

ABSTRACT

Título: Physiological quality and tolerance of genipap seeds submitted to drying.

The genip tree (*Genipa americana* L.) is a Neotropical fruit tree that ranges from northern South America to Argentina. It is used in urban afforestation, and has characteristics that aid degraded area restoration, while its fruit (genipaps) are economically important in the manufacture of confectionary, jams, wines and spirits. The propagation of the species occurs by seeds, but with slow and uneven germination. Therefore, understanding the germination processes in a species sensitive to desiccation is an important factor in solving genip seed storage problems. Consequently, the objective of the current study was to evaluate the influence of seed drying on genip germination and initial growth. Seeds were from the municipality of Umbaúba, Sergipe state, Brazil, and after cleaning, were submitted to different drying periods (0; 24; 48; 72; 96 and 120 hours) at a temperature of $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Germination occurred in polyethylene bags containing soil and washed coir in 2: 1 (v/v) proportions. Evaluated variables were: moisture content, germination percentage, germination speed index, seedling length, leaf number, leaf size, and seedling fresh and dry weight. Genip seeds are intermediate, losing viability as water content is reduced; seed viability was 80% when a drying period of 48 hours gave a moisture content of 32%. Under such conditions initial growth commenced 96 hours after drying.

Key-words: *Genipa americana* L., drying, initial growth.

5.1. INTRODUÇÃO

O jenipapo (*Genipa americana* L.) é uma fruta nativa do Brasil, pertencente à família Rubiaceae (SEMEDO & BAROBSA, 2007). A espécie pode ser utilizada em reflorestamentos de regiões com solo contaminado com cromo (SANTANA et al., 2012) e pode ser utilizada em restauração de áreas degradadas (MARSARO et al., 2014). Sob cultivo, possui boas características de crescimento, produção e adaptação ecológica (SANTOS et al., 2012). Devido aos altos teores de ferro, vitaminas B1, B2, B5 e C, e possui cálcio e hidratos de carbono em sua composição química, o jenipapo pode ser empregado na indústria cosmética, para fabricação de produtos utilizados no cabelo e na pele (ALMEIDA, 1993).

O avanço do conhecimento sobre a propagação do jenipapeiro é importante na adoção de tecnologias para incrementar a produção de mudas, que podem ser usadas em programas de melhoramento e também para o desenvolvimento de estratégias de conservação da biodiversidade (KHURANA & SINGH, 2001).

A propagação ocorre geralmente por sementes, classificadas como intermediárias (CARVALHO & NASCIMENTO, 2000) e possuem germinação lenta e desuniforme, emergindo de 8 a 13 dias (ANDRADE et al., 2000). Entender os processos germinativos e o estabelecimento de plantas em espécies sensíveis a dessecação (intermediárias e recalcitrantes) é importante para resolução de problemas de armazenamento (ROBERTS, 1973) uma vez que a armazenagem incorreta pode proporcionar alterações na composição de fosfolipídeos na membrana (WOLKERS et al., 1998), além de gerar perdas da habilidade das sementes se prevenirem ou repararem ataques de radicais livres (GREGAISEN et al., 2001). Dessa forma pode-se constatar uma diminuição da viabilidade, considerados letais ao cultivo (HONG & ELLIS, 1992).

É evidente a importância de estudos sobre a redução do teor de umidade e condições de armazenamento, fatores favoráveis à qualidade fisiológica das sementes, pois diminui a atividade biológica e as mudanças químicas e físicas que ocorrem durante o armazenamento (BAUDET et al., 1999). Manter sua viabilidade ainda é um dos maiores desafios enfrentados por pesquisadores para conservação em bancos de germoplasma (MAGISTRALI et al., 2013).

Além da qualidade inicial das sementes, a secagem eficiente pode evitar perda fisiológica e favorecer o armazenamento em condições ideais (SMANIOTTO et al., 2014). Ao contrário, podem ter impacto negativo na qualidade das sementes, afetando imediatamente a germinação e o vigor (MAHJABIN & ABIDI, 2015; PARAGINSKI et al., 2015).

Estudos que envolvam o comportamento de plantas submetidas à condição de estresses artificiais e armazenamento de sementes, proporcionam um melhor entendimento da capacidade de sobrevivência e adaptação em condições de estresses naturais, como seca e solos salinizados. Esse fator as torna disponíveis à programas (NERY et al., 2014).

A propagação de espécies frutíferas não domesticadas e com cultivo não estabelecido ainda é um gargalo para o sistema de produção e conservação de seus recursos genéticos. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência da secagem na germinação e crescimento inicial do jenipapeiro.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e na casa de vegetação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, no período de fevereiro a julho de 2018. As matrizes foram provenientes de população natural localizada no município de Umbaúba/SE. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é caracterizado por ser quente (24,4°C média anual) apresentando uma estação seca de pequena duração, que é compensada pela precipitação média anual de 1291mm.

Para obtenção das sementes, os frutos foram coletados maduros, estágio de maturação apropriado para consumo *in natura*, acondicionados em sacos plásticos e conduzidos para o laboratório onde foram despulpados manualmente, com auxílio de uma peneira de plástico. As sementes foram lavadas em água corrente para a retirada da mucilagem, mantidas a 25°C, por 24 horas, para finalizar a retirada do excesso de mucilagem. Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas aos tratamentos que consistiram em diferentes períodos de secagem: 0 (tratamento controle); 24; 48; 72; 96 e 120 horas. Ademais, sementes sem processo de secagem foram semeadas logo após o beneficiamento, utilizando substrato a terra adubada com pó da casca do coco lavado na proporção 2:1 (v/v). Os demais foram mantidos em estufa com circulação de ar e temperatura de 28 ± 2 °C. Nos intervalos preestabelecidos (0; 24; 48; 72; 96 e 120 horas), amostras de sementes foram retiradas do lote inicial para a realização dos testes e as avaliações:

a) Teor de umidade - foi determinado em estufa ($105 \pm 3^\circ\text{C}$) durante 24 horas de acordo com Regra de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), utilizando-se quatro repetições de 15 sementes para cada período de secagem;

b) Porcentagem de germinação - foi realizado em casa de vegetação, com irrigação por nebulização e sombrite com 50% de filtro de luz solar. As contagens tiveram início no 11º dia após a semeadura e a porcentagem de germinação foi efetuada no 34º após a semeadura quando houve a estabilização na emergência das plântulas. A contagem foi realizada quando os cotilédones estavam acima do substrato. Os resultados foram transformados em valor angular pela equação $\arcsin \frac{\sqrt{x}}{100}$ a fim de atenderem aos critérios de normalidade.

c) Índice de velocidade de emergência - foi avaliado concomitantemente ao teste de germinação, com contagens diárias a partir do décimo primeiro dia, seguido até o final do teste (34 dias), sendo índice calculado de acordo com a fórmula de Maguire, (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_n}{N_n}, \text{ em que:}$$

IVG = Índice de Velocidade de Germinação;

G_1 , G_2 , G_n = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda... e última contagem, respectivamente;

N_1 , N_2 , N_n = número de dias da semeadura à primeira, segunda e até última (n) contagem.

d) Comprimento das plântulas - foi mensurado ao final do experimento (180º dia após a semeadura), com auxílio de uma fita métrica, medindo-se desde a extensão da maior raiz até o meristema apical e expresso em centímetros.

e) Número de folhas das plântulas - foi verificado por meio de contagem, aos 180 dias.

f) Área foliar - Os valores foram resultados da multiplicação das variáveis comprimento e largura da folha ($C \times L$), em centímetros quadrados, aos 180 dias.

g) Massa fresca das plântulas – foram retiradas dos sacos plásticos contendo substrato, lavadas em água corrente, em seguida pesadas em balança analítica e o resultado dividido pelo total de plântulas e expresso em gramas.

h) Massa seca de plântulas - foram acondicionadas em sacos de papel, e colocadas em estufa à 80 °C por 24 h, sendo posteriormente pesadas em balança analítica e o resultado dividido pelo total de plântulas e expresso em gramas (NAKAGAWA, 1999).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso (DIC), com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias avaliadas pela análise de regressão polinomial.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A secagem afetou, significativamente, todas as variáveis mensuradas (ANEXO 1A). Por meio da curva de perda de umidade observou-se que, de acordo com o aumento da exposição das sementes, a temperatura de secagem houve uma acentuada diminuição na umidade das sementes, comportando-se de forma quadrática (Figura 1A). No tempo 0h, a umidade inicial média foi de aproximadamente 51,5% reduzindo nas primeiras horas (0-24h) e alcançando 10,24% após 120h de exposição. Essa redução pode ter ocorrido por mecanismos de movimento da água do interior para o exterior da semente, como difusão e ação capilar (HARTMAN FILHO et al., 2016).

As altas temperaturas ou exposição prolongada de sementes a temperatura de secagem podem provocar danos físicos e fisiológicos (OLIVEIRA et al., 2011). Em pitombeira (*Talisia esculenta* Radlk), Cardoso et al. (2015) verificaram redução no teor de umidade nas sementes após aumento no tempo de secagem, com perda de 9% da umidade nas seis primeiras horas. De forma semelhante, sementes de espécies de carvalho (*Quercus. coccifera* e *Quercus pubescens*) tiveram uma redução linear, alcançando teores de umidade abaixo de 20%, durante o tempo de dessecação (GANATSAS & TSAKALDIMI, 2013).

A porcentagem de emergência de plântulas diminuiu linearmente (Figura 1B) de 93,04% no tratamento controle (0h) para 59% após 120h de secagem, no momento em que o teor de umidade foi de aproximadamente 10%, uma redução de 37% no poder germinativo das sementes (Tabela 1). O tratamento 48h possibilitou uma taxa de germinação de aproximadamente 80%, valor mínimo comercial estabelecido pela RAS (BRASIL, 2009).

A secagem também afetou a germinabilidade das sementes (Figura 1C e Tabela 1). A partir da curva de germinação acumulada, observou-se que, as sementes não submetidas a processo de secagem germinaram entre 11 e 13 dias após a semeadura, enquanto o tratamento 96 h demorou entre 17 e 19 dias para iniciar a germinação. O tratamento 120h estabilizou aos 32 dias, com a menor taxa de germinação entre os tratamentos.

A atenuação da germinação está intimamente ligada a diminuição nos teores de água e redução da longevidade das sementes. O aumento no tempo de secagem ocasiona danos nos tecidos meristemáticos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do eixo embrionário (AFRAKHTEH et al., 2013). No presente estudo, houve diminuição do poder germinativo quando o conteúdo de água também foi menor.

Com relação ao vigor, (Figura 1D) houve redução na velocidade de emergência em função do período de secagem, com vigor mínimo de 0,745 alcançado às 110 horas. Durante o processo de formação, a semente passa por diferentes níveis de secagem e podem ser armazenadas com teores de água entre 10% e 13%. Nessa fase, o metabolismo e a taxa respiratória são baixos, porém, teores de água menores a 4% provocam danos irreversíveis

(GUIMARÃES, 1999). Os danos ocasionados pela perda de água refletiram diretamente na germinação das sementes.

A secagem afetou as variáveis germinativas de variedades de café (Big Coffee e Topázio) com teor de umidade menor que 11% (SOUZA et al., 2018). Analogamente, períodos de secagem superiores a 34 horas prejudicaram a qualidade fisiológica das sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), afetando a germinação e o vigor (SOARES et al., 2015).

Em sementes de jenipapeiro, Santos-Moura et al., (2012) constataram que a secagem pode ser feita por até 48 horas, sem comprometer a qualidade fisiológica. Houve redução da germinação e aumento da dormência em sementes de jenipapeiro com níveis de umidade abaixo de 10,3% (CARVALHO & NASCIMENTO, 2000).

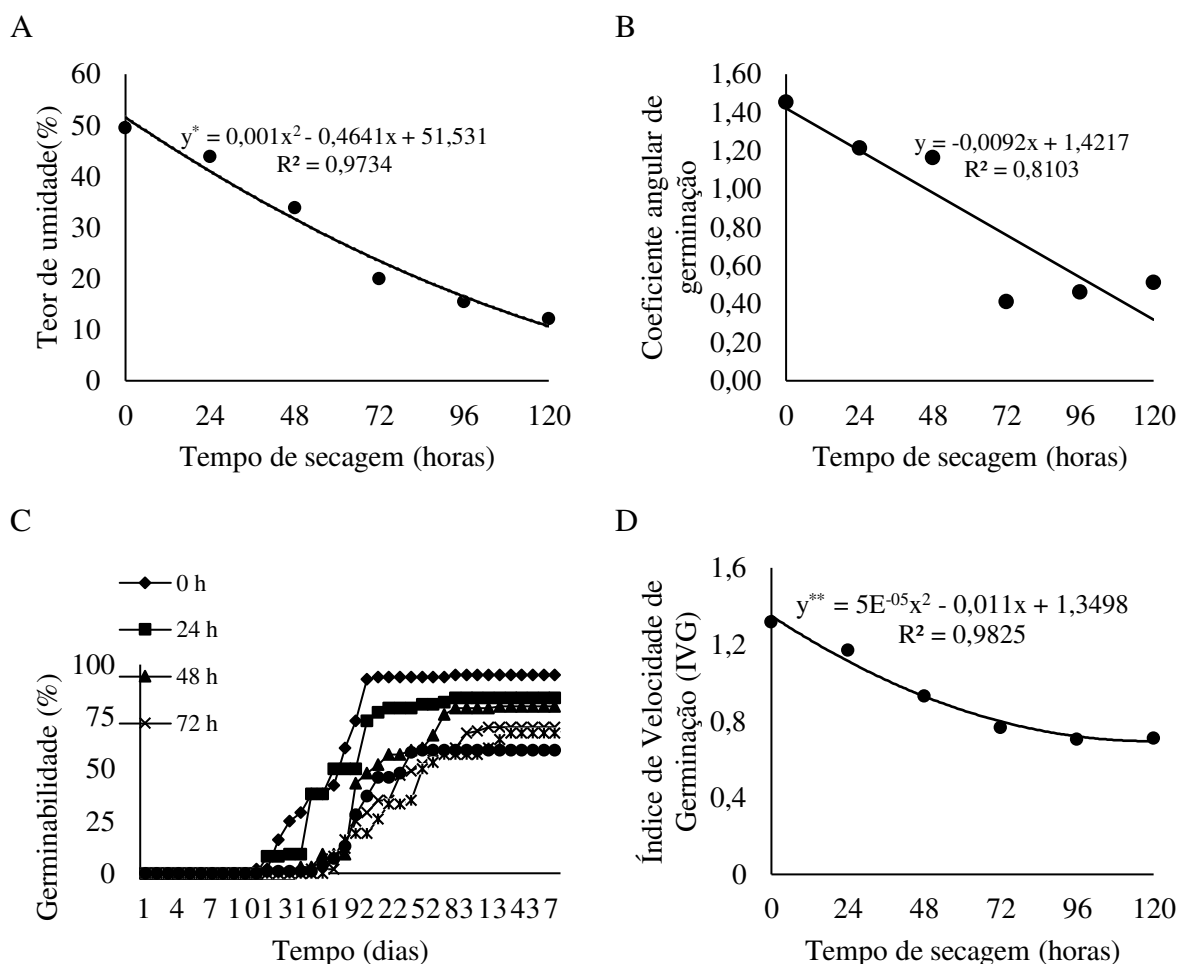


Figura 1. Teor de umidade (A); Porcentagem de germinação (B), Germinabilidade média (C) Índice de Velocidade de Emergência (D) de sementes de jenipapo submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.

As variáveis biométricas foram afetadas pela secagem de sementes (ANEXO 2A). O comprimento médio das plântulas foi de 50,96cm para sementes que não foram desidratadas, diminuindo para 37,72cm (48h) e e 29,11cm (120h). Após 130h, a expansão teve média aproximada de 28,98 cm (Figura 2A). Esses resultados podem ser explicados pelas alterações fisiológicas causadas pela longa exposição a temperatura de secagem, reduzindo a disponibilidade de reservas energéticas para o suprimento das plantas (OLIVEIRA et al., 2011). Em genótipos de mungumba (*Pachira aquática* Aubl - Malvaceae), Souto et al., (2017) verificaram que os maiores valores (8,3cm) foram observados em plantas provenientes de sementes que não foram submetidas à secagem, e os menores, das expostas a 96h de tratamento (6,1cm). Sendo assim, a deterioração causando desidratação também afetou o vigor, tornando

a germinação mais lenta e diminuindo o crescimento das plantas (SANTOS-MOURA et al., 2012).

Tabela 1. Efeito da secagem na germinação e germinabilidade de sementes de jenipapeiro submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.

Tratamentos (horas)	Germinação		Germinabilidade
	%	Valor angular	%
0	95 ± 5,0	1,45	95 ± 6,95
24	84 ± 6,32	1,21	84 ± 6,09
48	80 ± 6,73	1,16	80 ± 5,74
72	70 ± 0	0,41	70 ± 4,88
96	67 ± 0	0,46	67 ± 4,48
120	59 ± 0	0,51	59 ± 4,46
CV (%)	20,54		

O número médio de folhas foi de 10/plântula após 113h de secagem (Figura 2B). As áreas foliares também foram influenciadas pelo baixo teor de umidade (Figura 2C). O valor médio mínimo das dimensões foliares foi de 17,73cm² após 88h de secagem, enquanto as que não foram submetidas ao tratamento apresentaram média de 214,40cm², uma redução de 91,74%. Os tecidos meristemáticos são responsáveis pela síntese de novos tecidos (CARVALHO & NAKAGAWA, 2012) e são considerados mais sensíveis e propensos à deterioração (MARCOS FILHO, 2015). Assim, é possível que a longa exposição das sementes à temperatura de secagem tenha ocasionado danos aos tecidos com consequente redução na produção e expansão foliar.

A avaliação do crescimento por meio do número de folhas e áreas foliares das plântulas evidenciaram os efeitos negativos da temperatura de secagem sobre o desempenho do jenipapeiro. O mínimo de massa fresca (6,46g) foi observado após 104h (Figura 2D) e da massa seca (1,29g) após 124h de secagem (Figura 2E).

A secagem interferiu negativamente na qualidade fisiológica das sementes de jenipapeiro. Igualmente ocorreu em oiticica (*Licania rígida*), em que a qualidade fisiológica foi prejudicada após as primeiras horas de secagem com redução na massa seca de raiz de 0,26g no tratamento 8h para 0,07g após 24h de secagem (BRANDÃO et al., 2018). Do mesmo modo, as sementes de mangaba tiveram redução no comprimento e peso seco de plantas com sementes submetidas a períodos de secagem até 33h (SOARES et al., 2015).

A temperatura de secagem e o tempo de armazenamento afetam os mecanismos ligados aos processos de translocação e transformação de reservas cotiledonares em substâncias assimiladas pelo eixo embrionário, restringindo o acúmulo de matéria seca proveniente dos cotilédones (HARTMANN FILHO et al., 2016). Consequentemente, o comprometimento da nutrição embrionária, o acúmulo de matéria seca é restringido (JUNQUEIRA et al., 2018).

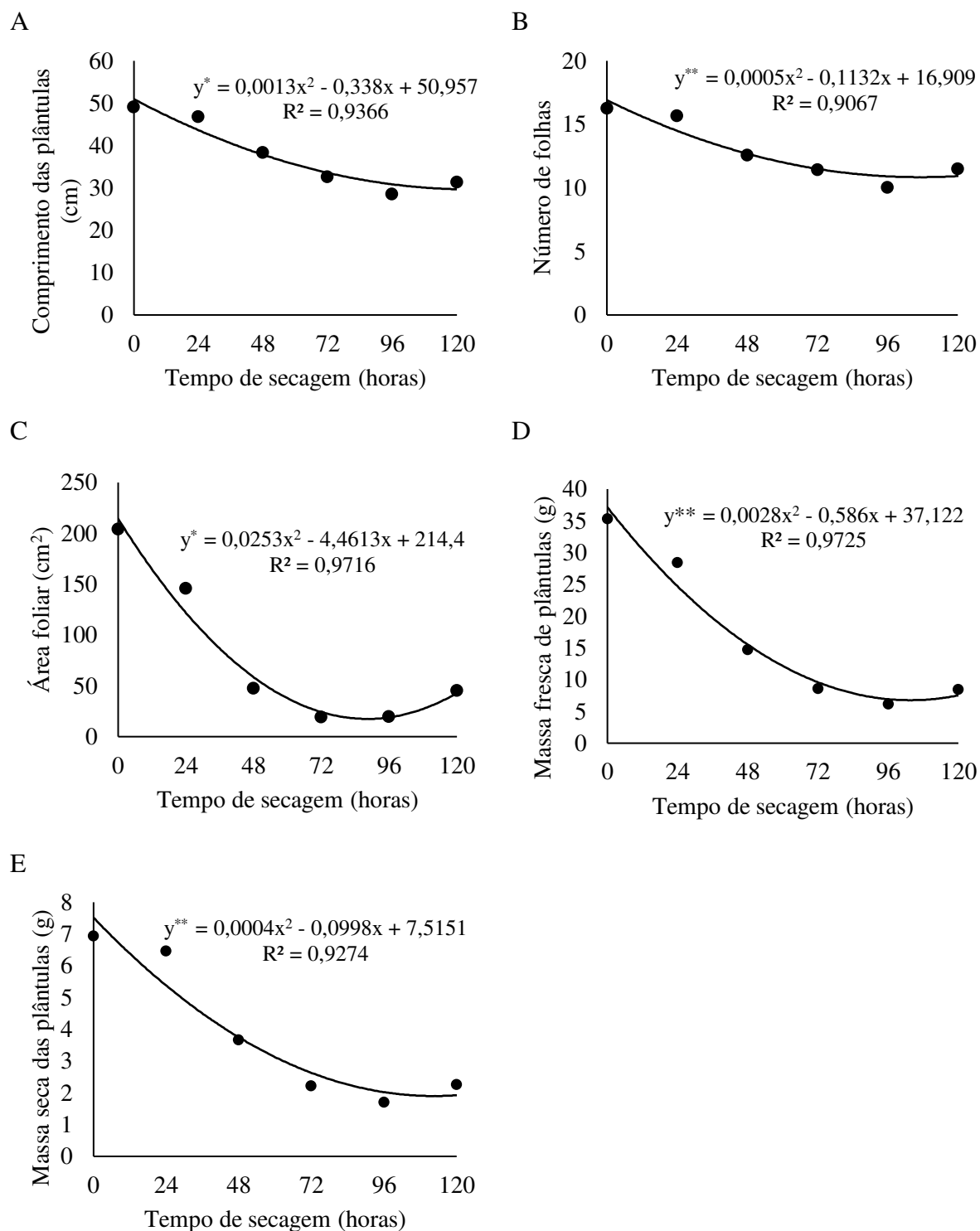


Figura 2. Comprimento (A); área foliar (B); Massa seca (C); Massa fresca (D) e número de folhas (E) de plântulas de jenipapeiro oriundas de sementes submetidas a 0; 24; 48; 72; 96 e 120h de secagem.

5.5. CONCLUSÕES

As sementes de jenipapo podem ser submetidas a temperatura de secagem de 28°C por 48 horas sem perder a viabilidade.

O teor de umidade de 32% mantém a alta viabilidade (80%) das sementes de jenipapeiro.

O crescimento inicial é comprometido por período de secagem superior a 96h.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRAKHTEH, S.; FRAHMANDFAR, E.; HAMIDI, A., RAMANDI, H.D. Evaluation of growth characteristics and seedling vigor in two cultivars of soybean dried under different temperature and fluidized bed dryer. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v.5, n.21, p.2537- 2544, 2013.
- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993. p.215-216.
- ANDRADE, A.C.; DE SOUZA, AF; RAMOS, FN; CRUZ A.P.M. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.
- BAUDET, L.M.L.; VILLELA, F.A.; CAVARIANI, C. Princípios de secagem. **Seed News**, n.10, p.20-27, 1999.
- BERJAK, P; PAMMENTER, N.W. Chapter 4: **Orthodox and recalcitrant seeds**. In: USDA Forest service's / reforestation, nurseries, e genetics resources. Tropical Tree Seed Manual, v. 4, n. 1, 2003, p. 137-147.
- BRANDÃO, E.D.; DINIZ NETO, M.A.; ARAÚJO, L.R.; SILVA, I.F.; BARBOSA, W.M.C.; MAIOLI, M.G.S. Períodos de secagem na qualidade fisiológica de sementes de *Licania rígida* Benth. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1798-1806, 2018.
- CARDOSO, E.A.; ALVES, E.U.; ALVES, A.U. *Talisia esculenta* seed quality in function of drying temperatures and times. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 7-16, 2015.
- CARDOSO, M.N.; NASCIMENTO, A.L.S.; OLIVEIRA, L.A.R.; ASSUNÇÃO, D.A.; MACHADO, C.A.; OLIVEIRA, A.C.A.; JESUS, A.S.; LEDO, A.S.; ARCHIMINIO, R.S.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae) populations in Sergipe, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 1, 2019.
- CARNEVALE, N.J.; MONTAGNINI, F. Facilitating regeneration of secondary forests with the use of mixed and pure plantations of indigenous tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 163, p. 217-22, 2002.
- CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n.1, p. 53-56, 2000.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p
- COSTA, J.A.; PIRES, J.L.F.; THOMAS, A.L.; ALBERTON, M. Comprimento e índice de expansão radial do hipocótilo de cultivares de soja. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.609-612, 1999.
- DELPRETE, P.G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Rubiáceas**: Flora Ilustrada Catarinense. Santa Catarina: Ademir Reis, v.2, p. 353-360, 2005.
- GANATSAS, P.; TSAKALDIMI, M. A comparative study of desiccation responses of seeds of three drought-resistant Mediterranean oaks. **Forest Ecology and Management**, v. 305, p. 189-194, 2013.

GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. 1999. Apostila (Curso de Especialização Pós-Graduação “Lato Senso” por Tutoria à Distância: Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras.

HAMACEK, F.R.; MOREIRA, A.V.B.; MARTINO, H.S.D.; RIBEIRO, S.M.; PINHEIRO-SANT’ANA, H.M. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do Cerrado de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Food Technology** v. 24, n. 1, p. 73-77, 2013.

HARTMANN FILHO, C.P.; GONELI, A.L.D.; MASETTO, T.E.; MARTINS, E.A.S.; OBA, G.C. The effect of drying temperatures and storage of seeds on the growth of soybean seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 287-295, 2016.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Optimum air-dry seed storage environments for Arabica coffee. **Seed Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 547-560, 1992.

JUNQUEIRA, M.H.; SIQUEIRA, V.C.; SCHOENINGER, V.; HARTMANN FILHO, C.P.; QUEQUETO, W.D.; LEITE, R.A.; MABASSO, G.A.; PEREIRA, C.G. Desempenho de plântulas de sementes de feijão BRS Estilo submetidas à diferentes temperaturas de secagem. **Global Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 304-314, 2018.

KHURANA, E.; SINGH, J.S. Ecology of tree seed and seedlings: implications for tropical forest conservation and restoration. **Current Science**, v. 80, n. 6, p. 748-757, 2001.

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

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

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAHJABIN, S.B.; ABIDI, A.B. Physiological and biochemical changes during seed deterioration: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, n. 4, p. 3416-3422, 2015.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Londrina: ABRATES, 2015. 659p.

MARSARO, C.C.S.; KESTRING, R.S.; FARIA, R.A.P.G.; VALENTINI, C.M.A. Viabilidade no emprego de diferentes espécies nativas para revegetação da área degradada do IFMT-Campus Cuiabá – Bela Vista. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, p. 25-37, 2014.

NAKAGAWA, J. Teste de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2-1 a 2-24.

NERY, M.C.; DAVIDE, A.C.; DA SILVA, E.A.A.; SOARES, G.C.M.; NERY, F.C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Cerne**, v. 20, n. 3, p. 477-483, 2014.

OLIVEIRA, L.M.; SILVA, E.O.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, E.U. Periods and dry environments in the seeds quality of *Genipa americana* L. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 495-502, 2011.

PARAGINSKI, R.T.; ROCKENBACH, B.A.; SANTOS, R.F.; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, M. Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p.358-363, 2015.

RABBANI, A.R.C.; SILVA-MAN, R.; FERREIRA, R.A. Variabilidade genética de *Genipa Americana* L. pertencente ao baixo curso do Rio São Francisco. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 401-409, 2012.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 499- 514, 1973.

SALLA, F.; JOSE, A.C.; FARIA, J.M.R. Análise ecofisiológica de *Genipa Americana* L. em banco de sementes induzido. **Cerne**, v. 22, n. 1, p. 93-100, 2016.

SANTANA, K.B.; ALMEIDA, 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 watershe. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, p. 35– 42, 2012.

SANTOS, S.C.; BUDKE, J.C; MULLER, A. Regeneração de espécies arbóreas sob a influência de *Merostachys multiramea* Hack. (Poaceae) em uma floresta subtropical. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 218-229, 2012.

SANTOS-MOURA, S.S.; ALVES, E.U.; BRUNO, R.L.A.; MOURA, M.F.; GONDIM, P.S.S. Influência de diferentes períodos de secagem na qualidade fisiológica de sementes de *Tapirira guianensis* Aublet. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 382-390, 2012.

SEMEDO, R.J.C.G.; BARBOSA, R.I. Árvores frutíferas nos quintais urbanos de Boa Vista, Roraima, Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 497-504, 2007.

SILVA, A.V.C.; SOARES, A.N.R.; CARDOSO, M.N.; MELO, M.F.V.; MUNIZ, E.N.; LEDO, A.S. Evaluation of Substrates for Jenipapo (*Genipa americana* L.) Seedlings Production. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, p. 352-358, 2018.

SMANIOTTO, T.A.S.; RESENDE, O.; MARÇAL, K.A.F.; OLIVEIRA, D.E.C.; SIMON, G.A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 446-453, 2014.

SOARES, A.C.F.; SOUZA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 2012.

SOARES, A.N.R.; MELO, M.F.V.; VITÓRIA, M.F.; SILVA, A.V.C. Physiological quality of mangaba seeds submitted to drying. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 52, p. 4806-4813, 2015.

SOUTO, P.C.; GONÇALVES, E.P.; VIANA, J.S.; FERREIRA, D.T.R.G.; RALPH, L.N.; SILVA, J.C.A. Caracterização de frutos, sementes e qualidade fisiológica de sementes de mungumba submetidas à secagem. **Magistra**, v. 29, n. 2 p. 182-191, 2017.

SOUZA, A.C.; ROSA, S.D.V.F.; VILELA, A.L.; FIGUEIREDO, M.A.; VILELA, A.L.O.; STÉPHANO FILHO, R.; CARVALHO, M.A.F. Big Coffee VL.: Seed desiccation tolerance, sieve classification and physiological quality. **Coffee Science**, v. 13, n. 4, p. 510 - 518, 2018.

SOUZA, R.K.D.; MENDONÇA, A.C.A.M.; DA SILVA, M.A.P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

STRONG, J.N.; FRAGOSO, J.M. Seed dispersal by *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata* in Northwestern Brazil. **Biotropica**, v. 38, p. 683–686, 2006.

ULLMANN, R.; RESENDE, O.; CHAVES, T.H.; OLIVEIRA, D.E.C.; COSTAS, L.M.; Qualidade fisiológica das sementes de sorgo sacarino submetidas à secagem em diferentes condições de ar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 1, p. 64-69, 2015.

VALERI, S.V.; PUERTA, R.; CRUZ, M.C.P.; Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Florestalis**, v. 64, p. 69-77, 2003.

WOLKERS, W.F.; BOCHICCHIO, A.; SELVAGGI, G.; HOEKSTRA, F.A. Fourier transform infrared microscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant Physiology**, v. 116, n. 3, p. 1169- 1177, 1998.

6. ARTIGO 3: Potencial fisiológico e crescimento *in vitro* de jenipapeiro (*Genipa americana* - Rubiaceae) sob salinidade.

Periódico submetido (ou a ser submetido): Enviroment and Experimental Botanic

RESUMO

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à família Rubiaceae e é considerado uma espécie economicamente promissora. A salinidade é um dos estresses abióticos responsáveis pela redução da produção de culturas em todo mundo e, para sobreviverem em locais salinos, as plantas desenvolvem mecanismos como acúmulo de osmólitos compatíveis e ativação enzimática para eliminação de espécies reativas em oxigênio. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do estresse salino no potencial fisiológico das sementes e no crescimento *in vitro* de acessos de jenipapeiro. Em gerbox, as sementes foram submetidas às concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl. A cada 72h foram extraídos eixos embrionários para determinar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Para avaliação do crescimento inicial, explantes dos acessos CER, SA e CRA foram inoculados em meio MS acrescido das concentrações 0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl e aos 30, 60 e 90 dias, a prolina foi quantificada. Verificou-se que a concentração de 50mM de NaCl afetou o potencial fisiológico das sementes, resultando no aumento da atividade das enzimas SOD e APX até 288h de exposição ao estresse salino. A salinidade promoveu diminuição no crescimento *in vitro* da espécie. O acesso SA apresentou maior tolerância ao estresse salino, que ocasionou incremento de prolina aos 30, 60 e 90 dias, indicando seu uso como indicador bioquímico para estresse em jenipapeiro.

Palavras-chave: Jenipapo; Enzimas Antioxidantes; Prolina; Frutíferas Nativas

ABSTRACT

Título: Physiological potential and *in vitro* growth of genip trees (*Genipa americana* - Rubiaceae) under salinity.

The genip tree (*Genipa americana* L.) belongs to the family Rubiaceae, and is considered an economically promising species. Technical knowledge about its propagation is required to define exploration strategies. Salinity is one of the abiotic stresses responsible for reducing crop production worldwide. For survival in saline sites, plants develop mechanisms such as accumulation of compatible osmolytes and enzymatic activation for the elimination of reactive species in oxygen. The objective of this study was to evaluate the effects of saline stress on the physiological potential of seeds and the *in vitro* growth of genip trees. In gerbox, the seeds were submitted to the following NaCl concentrations 0; 25; 50; 75 and 100 mM. Embryonic axes were extracted every 72 hours to determine the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX). To evaluate the initial growth, explants of the NB, SA and SF accessions were inoculated in MS medium plus 0; 25; 50; 75 and 100mM NaCl concentrations and at 30, 60 and 90 days, the proline was quantified. The 50 mM NaCl concentration was found to affect the physiological potential of the seeds, resulting in increased activity of the SOD and APX enzymes up to 288 hours of exposure to saline stenosis. Salinity causes a decrease in the *in vitro* growth of the species, and SA access showed a greater tolerance to saline stress, which caused an increase of proline at 30, 60 and 90 days, indicating its use as a biochemical marker for stress in genip trees.

Key-words: Genipap; Antioxidant Enzymes; Proline; Native Fruit.

6.1 INTRODUÇÃO

Genipa americana L. é espécie nativa em fase de domesticação e o domínio de conhecimentos técnicos a respeito de sua propagação é fundamental para a definição de estratégias de exploração. A salinidade é um dos principais estresses abióticos diretamente responsáveis pelo baixo crescimento de plantas, com consequente redução na produção (AFRIDI et al., 2019). Mais de 6% do total de terras (aproximadamente 800 milhões de hectares) são afetados por condições salinas em regiões áridas e semiáridas no mundo (SARKAR et al., 2018).

É uma espécie secundária tardia, tolerante ao sombreamento moderado quando jovem e com intensa regeneração em áreas com atividades antrópicas (CARVALHO, 1994). Pode sobreviver e se desenvolver por até 60 dias sob alagamento sem danos no aparato fotossintético (MIELKE et al., 2003). Pela adaptabilidade, a espécie é indicada para uso em programas de restauração em áreas degradadas (MARSARO et al., 2014). Considerada uma espécie nativa farmacologicamente promissora, usada na indústria alimentícia, campos farmacológicos e biomédicos (NERI-NUMA et al, 2017).

A elevada salinidade do solo tem efeitos drásticos nas propriedades físicas e químicas do solo, suprime o crescimento e a variedade da microbiota do solo (SAIRAM et al., 2002). Mais de 57% das terras cultiváveis tem uma salinidade que varia de 16 a 32 dS.m⁻¹, sendo tais condições satisfatórias apenas para plantas tolerantes (MOMENI, 2010), pois o sal acumula-se na zona radicular e reduz o rendimento da lavoura (YARAMI & SEPASKHAH, 2015).

A concentração salina em solos superficiais é maior, que a de solos mais profundos, justificando maiores danos à germinação (YARAMI & SEPASKHAH, 2015). O sal afeta a germinação de sementes por meio de efeitos osmóticos (LIMA et al., 2005), toxicidade iônica ou uma combinação dos dois (KHAN & UNGAR, 1998; MUNNS & TESTER, 2008). O efeito primário da salinidade é um potencial osmótico reduzido no ambiente, afetando a absorção de água (SOARES et al., 2015), que é essencial para ativação, decomposição e translocação de reservas de sementes por enzimas, afetando o processo geral da germinação (MUNNS &

TESTER, 2008). Semelhante ao estresse salino, a restrição hídrica no potencial osmótico -0,3 MPa garante o condicionamento osmótico em sementes de jenipapeiro sem redução na taxa de germinação (SANTOS et al., 2011).

Alterações no equilíbrio celular, causados pela alta concentração de sais, podem levar a um aumento na produção de espécies reativas em oxigênio (ERO's) a níveis tóxicos às células, dentre elas o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem causar oxidação de lipídios das membranas, proteínas e ácidos nucleicos, levando a morte celular (YAO et al., 2012).

Enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) são enzimas que fazem parte do mecanismo de defesa da planta, auxiliando na eliminação e neutralização de ERO's produzidas sob estresse salino (SECKIN et al. 2010). Sob desidratação o jenipapeiro não apresentou modificações nos teores de superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (SANTANA NETA, 2014). Em demais condições de estresse, as informações sobre ativação enzimática em jenipapeiro são escassas.

No estabelecimento das plantas, o primeiro efeito da salinidade é a redução do crescimento, causada pela diminuição do potencial hídrico na solução do solo a um nível abaixo do necessário para absorção de água pelas células da raiz, o que impede a expansão das células (TAIZ & ZEIGER, 2010). Para que a absorção de água não se torne inviável, é fundamental que a planta baixe seu potencial hídrico a um patamar inferior ao do solo (WILLADINO & CAMARA, 2010).

O processo de ajuste osmótico ocorre mediante a elevação da concentração de solutos compatíveis tornando-se um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para proteger e manter a turgescência celular, mantendo a absorção de água e a pressão de turgor celular (MARIJUAN & BOSCH, 2013). O aminoácido prolina é o soluto compatível mais estudado, em razão de sua sensibilidade de resposta a condições de estresse (ASHRAF et al., 2011).

Diversas tecnologias são utilizadas para simulação de estresses abióticos em plantas, sendo que a cultura de tecidos de plantas é uma técnica prática e econômica da biotecnologia vegetal realizada sob condições assépticas que consegue simular condições de estresse (BAIRU et al., 2011).

Devido à importância dessa espécie, todo avanço no conhecimento é de fundamental importância tanto para sua conservação como para organizar um futuro sistema de produção. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do estresse salino na germinação e produção de enzimas antioxidantes em sementes de jenipapeiro, bem como crescimento *in vitro* e produção de prolina em explantes da espécie.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Germinação sob salinidade

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/ SE, em maio de 2018. As sementes utilizadas no ensaio de germinação sob salinidade foram extraídas de frutos oriundos de matriz localizada em Umbaúba/SE (11°23'1,9009" S; 37°38'59,99024" W). O clima da região, segundo classificação de Köppen é caracterizado por ser quente (24,4°C média anual) apresentando uma estação seca de pequena duração que é compensada pelos totais elevados de precipitação com média anual de 1291mm.

Para obtenção das sementes, os frutos foram despolpados manualmente, com auxílio de peneira. As sementes foram lavadas em água corrente para retirada da mucilagem e mantidas sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas. Após o beneficiamento, as sementes passaram por assepsia em detergente, posteriormente colocadas em solução de álcool 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos, seguida de três lavagens em água destilada e autoclavada. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução do fungicida Captan® 0,5% por 5 minutos, tempo determinado por testes preliminares realizados.

Para simulação do estresse salino, a sementeira foi realizada sobre duas folhas de papel *Germitest*, em caixas do tipo *gerbox*, umedecidas com os tratamentos salinos (0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl), no volume de 2,5 vezes o peso do papel. As caixas foram acondicionadas em câmara de germinação do tipo *Biochemical Demand Oxygen* (BOD), equipada com lâmpadas fluorescentes sob temperatura constante de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob escuro por 40 dias.

A contagem da germinação das sementes nestas condições foi realizada diariamente computando-se o início da protrusão das radículas e avaliadas até a formação de plântulas de acordo com Brasil (2009). Foram avaliados:

a) Viabilidade das sementes: avaliada por meio da porcentagem de germinação (%G), levando em consideração a formação de plântulas normais.

$\% G = (N/A) \times 100$, em que:

% G= porcentagem de germinação;

N= número de sementes germinadas

A= número total de sementes colocadas para germinar.

As contagens tiveram início no 8º dia após a sementeira e a porcentagem de germinação foi efetuada no 40º dia após a sementeira quando houve a estabilização na emergência das plantas. Os resultados foram transformados em valor angular pela equação $\arcsin \frac{\sqrt{x}}{100}$ a fim de atenderem aos critérios de normalidade.

b) Vigor das sementes: avaliado pelo Índice de Velocidade de Germinação (IVG) segundo MAGUIRE (1962), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Velocidade Média de Germinação (LABOURIAU, 1983). Sendo assim:

$$\text{IVG} = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_n}{N_n}, \text{ em que:}$$

IVG = Índice de Velocidade de Germinação;

G_1, G_2, G_n = número de plântulas germinadas, computadas na primeira, na segunda e até a última (n) contagem;

N_1, N_2, N_n = número de dias da sementeira à primeira, segunda e até última (n) contagem.

$$\text{TMG} = \frac{\sum(n_i.t_i)}{\sum n_i} \text{ em que:}$$

TMG= Tempo Médio de Germinação (em dias);

$\sum n_i$ = número de sementes germinadas em um intervalo de tempo;

$\sum t_i$ = intervalo de tempo de germinação.

$$V = \frac{1}{\text{TMG}} \text{ em que:}$$

V= Velocidade média de germinação

TMG= Tempo médio de germinação.

6.2.2 Enzimas antioxidantes

Para análise da atividade das enzimas antioxidantes, um novo lote de sementes extraídas de frutos da matriz de Umbaúba/SE foi submetido a soluções de NaCl, nas mesmas concentrações salinas descritas anteriormente (item 6.2.1). A cada 72h (do tempo 0h a 360h) de sementeira, os eixos embrionários foram excisados e congelados em ultrafreezer -80°C até a data da avaliação. As sementes foram retiradas de cada tratamento até que a contagem total de germinação do tratamento controle alcançasse 50%.

Para determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,1g dos embriões em 1,5mL de solução tampão de extração de fosfato de potássio (0,1M, pH 7,0), contendo 0,1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a $14000 \times g$ por 20 minutos a 4°C (PEIXOTO et al., 1999).

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático bruto a 3,0mL do meio de reação, que consistiu de 50mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) e

0,1mM de EDTA. Adicionou-se um sistema gerador de superóxido contendo 14,3mM de metionina, 82,5mM de p-nitro azul de tetrazólio (NBT) e 2,2 μ M de riboflavina (DEL LONGO et al. 1993). A reação ocorreu a uma temperatura de 25°C $\pm$ 2 em uma câmara de germinação do tipo BOD equipada com quatro lâmpadas fluorescentes de 20W. Os tubos foram mantidos 30cm abaixo da fonte de luz durante 15 minutos e após esse tempo as lâmpadas foram desligadas e o formazan azul que foi produzido por meio da fotorredução de NBT foi medido por absorbância a 560nm. O valor da absorbância de todos os reagentes juntamente com o extrato enzimático bruto mantidos no escuro pelo mesmo período serviu como branco e foi subtraído do resultado de cada amostra que recebeu luz (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A atividade enzimática foi expressa como unidade SOD, sendo que 1 SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir cerca de 50% de NBT sob as condições de ensaio (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático bruto a 2mL do tampão de reação composto por 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e H₂O₂ 10mM (adaptado de HAVIR & MCHALE, 1987). A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da diminuição da absorbância a 240nm (ϵ = 36/mM/ cm) por 2 minutos em intervalos de 15 segundos. A taxa de redução do ensaio (ΔA) foi utilizado para determinar a atividade enzimática e foi expressa como μ mol / min.g.

A atividade APX foi determinada de acordo com Nakano & Asada (1981). A solução da reação com total de 2mL foi composta por 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), EDTA 0,1mM, ascorbato de sódio 0,25 mM, H₂O₂ 1mM e 100 μ L do extrato enzimático bruto. A oxidação do ascorbato dependente de H₂O₂ foi medida por meio da diminuição da absorbância a 290nm (ϵ = 2.81/mM cm) durante 5 minutos a cada 30 segundos. A atividade de APX foi expressa por μ mol/min.g.

6.2.3 Crescimento *in vitro* de acessos de jenipapeiro em meio de cultura salino

Neste ensaio foram utilizadas microestacas de aproximadamente 1,0cm contendo uma única gema, extraídas de plantas pré-estabelecidas e multiplicadas *in vitro* a partir de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo (BAG Jenipapo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo da Embrapa Tabuleiros Costeiros utilizados para ensaio de salinidade *in vitro*.

Acesso	Origem
CER	Núcleo Bandeirante, Distrito Federal/DF
SA	Povoado Sabinópolis, Siriri/SE
CRA	São Félix, Cruz das Almas/BA

Em câmara de fluxo laminar, as microestacas foram inoculadas em frascos de vidro contendo 30mL meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações salinas (0; 25; 50; 75; 100 mM de NaCl) solidificado com 3,5g. L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,7 $\pm$ 0,1. Após inoculação, os recipientes foram tampados e transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 °C $\pm$ 2 °C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 h com intensidade luminosa de 60 μ mol.m⁻². s⁻¹.

Após 90 dias foram avaliados número de raiz, número de folhas, número de brotos, comprimento da plântula (da raiz ao hipocótilo), número de gemas, diâmetro de caule e massa seca de parte aérea.

6.2.4 Quantificação de prolina

A quantificação de prolina foi determinada pelo protocolo de Bates et al., (1973) modificado com a substituição da filtração por centrifugação dos extratos. A extração de prolina foi feita aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação dos explantes ao meio de cultura contendo NaCl.

Aproximadamente 0,1g de material fresco foram maceradas e homogeneizadas em 10mL de ácido sulfosalicílico a 3%, sendo 3 mL para macerar por cerca de 2 minutos e 7 mL para lavar o almofariz. Os extratos foram centrifugados a 5000 x g por 20 minutos a 2 °C. Em um tubo foram adicionados 1 mL do sobrenadante do extrato, 1 mL de ácido acético, 1 mL de ninidrina ácida e levados a banho-maria (100 °C por 1 hora). O processo foi interrompido em banho de gelo quando a curva padrão (controle) apresentou a cor rosácea. Nas amostras, acrescentou-se 2mL de Tolueno e a solução foi agitada em vórtex por 5 segundos para separação das fases (uma rosácea e uma transparente). Com auxílio da pipeta de Pasteur, o cromóforo foi aspirado para leitura da absorbância a 520 nm usando o Tolueno como branco. A concentração de prolina foi expressa em $\mu\text{mol/g}$ e o teste foi realizado em duplicatas.

6.2.5 Delineamento experimental

Todos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para os dados de germinação, os resultados foram analisados usando a Análise de Variância (ANOVA) empregando o estudo de Análise de Regressão Polinomial ($p < 0,05$), com regressões polinomiais ajustadas para os tratamentos salinos.

O experimento de enzimas antioxidantes foi organizado em esquema de parcela subdividida no tempo, com o fator tratamento salino na parcela e o tempo de exposição a salinidade na subparcela, com duas repetições. Para os níveis de NaCl, foi utilizado o teste de regressão ($p < 0,05$) e para o tempo o teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Para o crescimento *in vitro* utilizou-se o esquema fatorial 3 x 5 (3 acessos e 5 concentrações salinas), com 7 repetições formadas por 3 plantas. Os níveis de NaCl foram avaliados pelo teste de Regressão e os acessos foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na quantificação da prolina, o esquema utilizado foi de parcela subdividida no tempo, com os fatores acessos (CER, SA, CRA) e concentrações de NaCl (0; 25; 50; 75 e 100 mM) na parcela, e o tempo na subparcela. Para os tratamentos salinos, foi utilizado o teste de regressão com regressões polinomiais, e para tempo e acesso as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Efeito da salinidade na germinação

Os tratamentos salinos apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) apenas para a porcentagem de germinação e Índice de Velocidade de Germinação (ANEXO 3A).

A porcentagem de germinação das sementes de jenipapeiro demonstrou médias menores a partir do incremento salino, passando de aproximadamente 80% no tratamento controle a 40%, na concentração 50mM e próximo a 0% em 100mM (Figura 1A).

A distribuição das porcentagens de germinação acumuladas (Figura 1B) reforçam o efeito significativo da salinidade na germinabilidade das sementes de jenipapeiro. A obtenção de germinação máxima no tratamento 0mM foi demonstrada entre 37 e 39 dias enquanto o início da germinação deu-se entre 7 e 9 dias, sugerindo esse período para primeira contagem. Os tratamentos 25mM e 50mM apresentam sincronização, demorando entre 9 e 11 dias para iniciar a germinação e 35 a 37 dias para estabilizá-la. A germinação, embora com baixa taxa, foi estabilizada aos 35 dias nos tratamentos 75mM e 100mM e o tratamento 100mM apresentou germinação mais tardia entre os tratamentos, com início entre 15 e 17 dias.

A alta concentração de sais é um fator estressor para a planta, pois a água fica retida na solução salina, de forma que o aumento da adição de sais torna a água cada vez menos disponível, reduzindo o potencial osmótico dos tecidos (RIBEIRO et al., 2001). As sementes

sofrem influência negativa da condição salina principalmente do cloreto de sódio (NaCl), que pode inibir a germinação (LIMA et al., 2005). As condições salinas as quais as sementes de jenipapeiro foram submetidas, afetaram a germinação e germinabilidade.

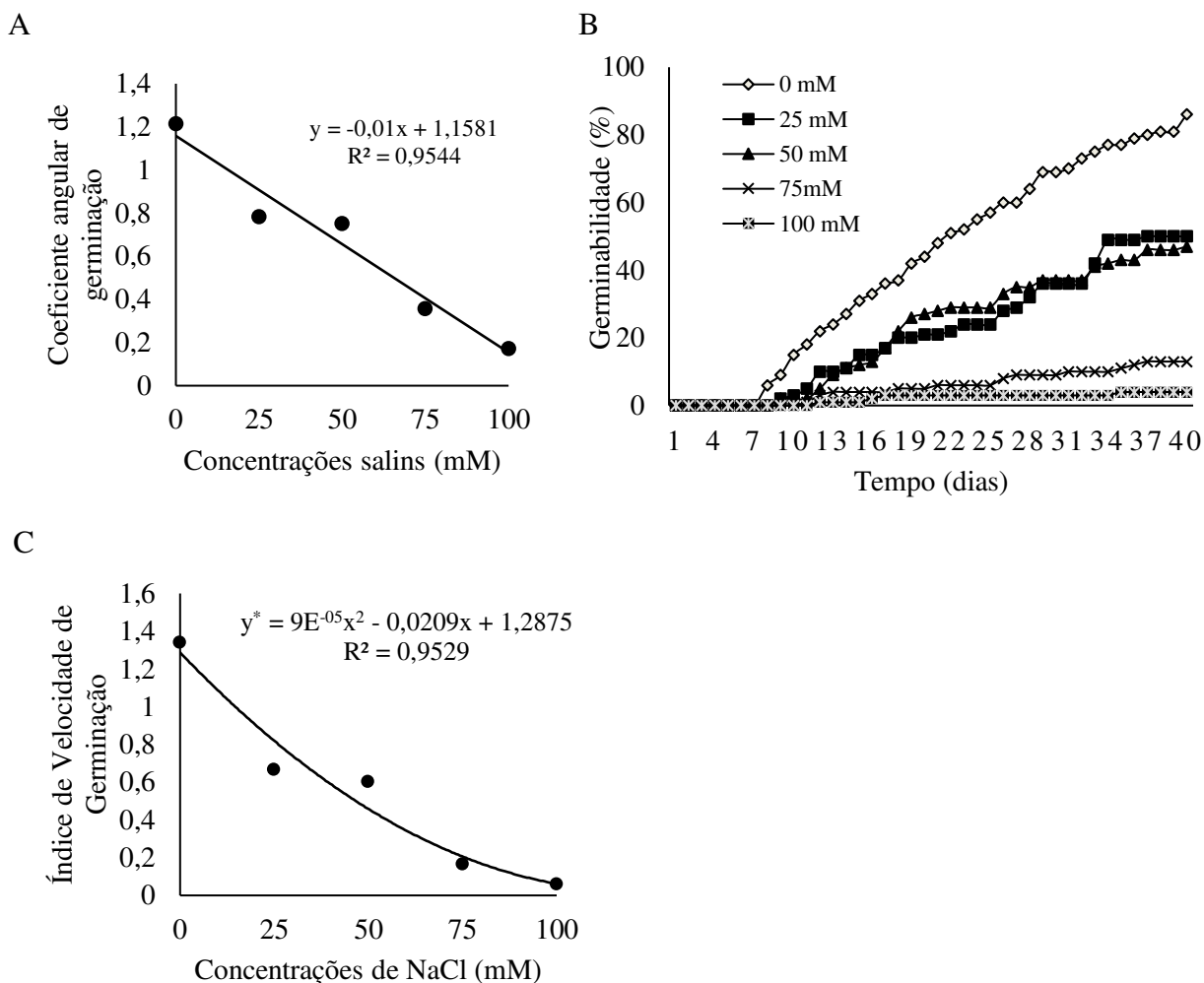


Figura 1. Porcentagem de germinação (A), Germinabilidade média (B) Índice de Velocidade de Germinação (C) de sementes de jenipapo submetidas a estresse salino (0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl).

Tabela 2. Efeito das concentrações salinas (0; 25; 50; 75 e 100mM) na germinação e germinabilidade de sementes de jenipapeiro.

Concentrações salinas (mM)	Germinação		Germinabilidade
	%	Valor angular	%
0	86	$1,21 \pm 0,09$	$86 \pm 4,63$
25	50	$0,78 \pm 0,10$	$50 \pm 2,79$
50	47	$0,75 \pm 0,08$	$47 \pm 2,71$
75	13	$0,35 \pm 0,06$	$13 \pm 0,70$
100	4	$0,17 \pm 0,06$	$4 \pm 0,24$
CV (%)	24,63		

Quanto ao Índice de Velocidade de Germinação (Figura 1C), as sementes germinaram de modo cada vez mais lento, com valor mínimo de 0,0741 na concentração salina aproximada de 116mM. Pela semelhança entre a tendência das curvas de porcentagem de germinação e do

IVG, pode-se afirmar que as sementes que germinaram mais rápido foram as que apresentaram maior porcentagem de germinação.

A germinação de videiras silvestres [*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi; Vitaceae] foi afetada pelo aumento de sal, alcançando maiores percentuais no tratamento não salino e 2% de germinação na concentração 250mM (SANTO et al., 2019). Genótipos de manga (*Mangifera indica* L.; Anacardiaceae) podem germinar em níveis de salinidade de 0mM a 50 mM de NaCl (NIMBOLKAR et al., 2018). Em melão (*Cucumis melo* L.; Cucurbitaceae), a porcentagem e taxa de germinação mais altas ocorreram nas concentrações salinas controle e redução nas variáveis nas concentrações acima de -0,4 MPa de NaCl (SOHRABIKERTABAD et al., 2013). A salinidade também reduziu a germinação de sementes e ocasionou atraso na germinação de porta-enxertos de citrus (EL-DESOUKY & ATAWIA, 1998).

6.3.2 Enzimas antioxidantes

Houve efeito entre os tratamentos salinos e os diferentes tempos de embebição (ANEXO 4A). Os valores da atividade de SOD, APX e CAT encontram-se na Tabela 2.

A interação entre o tratamento salino e o tempo de exposição das sementes ao estresse foram estatisticamente significativos. De forma geral, o tempo de exposição afetou a ativação enzimática (Tabela 2).

Para enzima SOD, as maiores médias foram observadas nos tempos de 288h e 360h após semeadura. Verificou-se uma diminuição na atividade nos intervalos de tempo de 144 horas e 216 horas nos tratamentos, período de grande ativação metabólica. No tempo 288 horas houve uma maior eficiência na detoxificação celular nos tratamentos salinos mais severos (75mM e 100mM) e, em 360 horas, a eficácia enzimática foi verificada no tratamento controle e 25Mm (1,773 e 1,856 U SOD). Esses resultados corroboram com os encontrados por Fan et al. (2013), que avaliaram sementes de pepino submetidas ao estresse salino e atribuíram a SOD um papel fundamental no mecanismo de defesa antioxidante.

Após exposição aumentada a condições de estresse salino, a produção de EROs é intensificada devido a baixa concentração de CO₂ em função do fechamento estomático (DABROWSKA et al., 2007) e da limitação na fixação de CO₂ no ciclo de Calvin diminuindo a oxidação de NADPH, levando o elétron da ferredoxina para o O₂ formando radicais superóxido (O₂^{•-}) (AHMAD et al., 2008) que devem ser eliminados para evitar estresse oxidativo. Sendo assim, a ação sincronizada das enzimas responsáveis pela remoção dos EROs confere uma maior proteção e tolerância da espécie a condições de estresse (DEUNER et al., 2011). A SOD é a primeira linha de defesa, realizando a dismutação do radical a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), justificando sua maior atividade em relação as demais enzimas avaliadas.

A atuação das rotas envolvendo as enzimas APX e CAT são simultâneas, o que pode resultar na baixa atividade de ambas (FLORES et al., 2014). A detoxificação celular pela remoção de H₂O₂, formação de água e oxigênio, é feito por ambas enzimas, que pertencem a diferentes grupos devido a diferença de afinidade pelo peróxido de hidrogênio, com a APX na ordem de µM e a CAT em mM (MITTLER, 2002).

Tabela 3. Atividade de enzimas antioxidantes em sementes de acessos de jenipapeiro submetidas a diferentes concentrações salinas (0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl) em diferentes tempos (0; 72; 144; 216; 288 e 360 horas).

Superóxido Dismutase- SOD (unidade SOD)							
Tempo (horas)	Tratamentos salinos (mM)					Regressões	R²
	0	25	50	75	100		
0	1,632 _b	1,522 b	1,478b	1,507 a	1,669 a	$y^{**} = 7E^{-05}x^2 + 0,0068x + 1,6384$	- 0,9828
72	0,990 _c	1,155 c	1,204 c	1,165 b	1,368 c	$y^{**} = 0,0031x + 1,0237$	+ 0,8052
144	1,709 _b	1,036 d	1,551 a	1,110 b	1,507 b	$y^{**} = 0,0001x^2 + 0,0148x + 1,6178$	- 0,3216
216	1,816 _a	1,210 c	1,408 b	1,491 a	1,524 b	$y^{**} = 0,0001x^2 + 0,0145x + 1,7165$	- 0,5486
288	1,635 _b	1,560 b	1,505 b	1,627 a	1,699 a	$y^{**} = 5E^{-05}x^2 + 0,0046x + 1,6336$	- 0,8836
360	1,773 _a	1,856 a	1,621 a	1,508 a	1,632 a	$y^{**} = -0,0025x + 1,8043$	+ 0,5298
CV (%)	4,03						
Ascorbato Peroxidase- APX (μmol/min. g)							
0	0,792 _a	0,725 a	0,740 a	0,681 b	0,666 b	ns	ns
72	0,501 _b	0,688 a	0,691 a	0,718 b	0,747 b	ns	ns
144	0,510 _b	0,458 b	0,644 a	0,376 c	0,469 c	ns	ns
216	0,441 _b	0,491 b	0,295 b	0,437 c	0,754 b	$y^{*} = 1E^{-04}x^2 - 0,0077x + 0,4942$	0,7714
288	0,328 _b	0,916 a	0,673 a	1,238 a	1,140 a	$y^{**} = 0,0078x + 0,4703$	+ 0,6977
360	0,485 _b	0,385 b	0,127 b	0,464 c	0,367 c	ns	ns
CV (%)	20,90						
Catalase- CAT (μmol/min. g)							
0	0,454 _a	0,457 a	0,460 a	0,422 b	0,458 a	ns	ns
72	0,321 _a	0,256 a	0,051 a	0,103 b	0,128 a	ns	ns
144	0,481 _a	0,152 a	0,032 a	0,187 b	0,117 a	ns	ns
216	0,011 _a	0,019 a	0,026 a	0,028 b	0,035 a	ns	ns
288	0,013 _a	0,021a	0,015 a	0,025 b	0,042 a	ns	ns
360	0,005 _a	0,006 Ba	0,010 a	1,502 a	0,013 a	$y^{*} = -0,0002x^2 + 0,0231x - 0,2084$	+ 0,2172
CV (%)	12,12						

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de Skott Knott ($p < 0,05$). ns= na significativo.

Para ascorbato peroxidase, não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos até 144 h após semeadura onde ocorreu um aumento na atividade da APX a partir do tempo 216 horas nas concentrações 75mM e 100 mM de NaCl, consequência de uma maior exclusão de H_2O_2 produzido pela SOD. A menor ativação deu-se no tratamento 38,5 mM com média 0,3459 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$. No tempo 288 horas o aumento na atividade enzimática foi de aproximadamente 165% quando comparado ao controle, passando de 0,4703 $\mu\text{mol}/\text{min. g}$ para 1,2503 $\mu\text{mol}/\text{min. g}$ (Tabela 2).

A enzima CAT é importante nas fases iniciais da germinação, removendo o H_2O_2 produzido durante a β -oxidação de ácidos graxos (BEWLEY et al., 2013). A atividade de CAT em geral, foi inferior a APX, justificado pela sua menor afinidade pelo H_2O_2 , desta forma, a enzima APX obteve uma maior eficiência. As médias correspondentes a atividade da CAT fora estatisticamente similar para os tratamentos e tempos testados, exceto para o tempo de 360 horas que obteve média superior na concentração salina de 75 mM (1,502 $\mu\text{mol}/\text{min. g}$).

A absorção de água pelas sementes é essencial para atividades das enzimas antioxidantes e ao mesmo tempo, ativa em sementes sob estresse, vias metabólicas que contribuem na geração e acumulação de EROs, afetando negativamente a germinação (YAO et al., 2012). A peroxidação lipídica decorrente de altas concentrações salinas resulta na formação de malondialdeído (MDA), o que caracteriza danos nas membranas celulares, e como consequência a inativação de enzimas antioxidantes pelo acúmulo excessivo de radicais livres, ocasionando potenciais danos oxidativos e morte celular pela exposição ao NaCl (KHAN & PANDA, 2008). Tais fatores podem explicar a baixa atividade das enzimas nesse estudo e redução no potencial germinativo das sementes.

Em estudos com tomates (*Solanum lycopersicum*; Solanaceae) submetidos à irrigação salina, Alves et al. (2018) obtiveram uma maior atividade da enzima CAT em comparação a APX na remoção de H_2O_2 . Houve aumento de 8% e 11% na atividade de SOD e CAT em cultivares de manga (*Mangifera indica* L.; Anacardiaceae) tratadas com sal (SRIVASTAV et al., 2010). A atividade de SOD, APX e CAT sob estresse salino induzido foi relatada também por Deuner et al. (2011) em genótipos de feijão (*Vigna unguiculata* (L.) Walp; Fabaceae) e concluíram que nas concentrações intermediárias de sal (50 mM e 100 mM) as enzimas antioxidantes apresentam atividade eficiente contra estresse salino. Houve um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes em sementes de melão (*Cucumis melo* L.; Cucurbitaceae) após 48 horas de exposição ao estresse salino (PINHEIRO et al., 2016).

6.3.3 Efeito da salinidade no crescimento *in vitro* de micrestacas

As concentrações salinas e os acessos influenciaram de forma isolada para o número de raiz, número de folha, número de brotos e número de gemas. Apenas os tratamentos salinos foram significativos para diâmetro de caule. A interação dos fatores (concentração salina x genótipo) influenciou de forma significativa o tamanho de raiz, comprimento das plantas e massa seca (ANEXO 5A) afetando o crescimento *in vitro* de explantes de jenipapeiro pela presença de NaCl.

O número de raízes produzidas teve diminuição com o incremento de sal ao meio (Figura 2A), passando de 0,73 raízes em média no tratamento controle para 0,29 raízes no tratamento 100 mM. Dos acessos testados, SA demonstrou maior média na produção de raízes (0,857/planta) enquanto CER e CRA tiveram 0,297/planta e 0,369/planta, uma redução de 65% e 56% aproximadamente (Tabela 3). A redução da divisão celular e da expansão das células em tecidos meristemáticos como raiz é efeito direto da salinidade (FORNER-GINER et al., 2011) por ser o primeiro órgão afetado. Segundo Munns et al. (2002) a redução na produção de raízes é resultado exclusivo de mudanças nas relações hídricas da célula.

A diminuição nos parâmetros de crescimento é resultado do estresse osmótico, toxicidade de íons e desequilíbrio de nutrientes causados pelo estresse salino (BERNSTEINS, 1964). A salinidade induz estresse osmótico, que reduz a absorção de água. Para evitar a desidratação, é necessário que as plantas ativem mecanismos de tolerância e podem produzir mais raízes e raízes

mais longas para maximizar a absorção de água (TEH et al., 2014), que foi constatado nesse estudo.

Tabela 4. Número de raízes, comprimento de plântula, número de folhas, número de brotos, número de gemas/diâmetro de caule e massa seca de três acessos de jenipapeiro submetidos ao estresse salino *in vitro* nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl.

Acessos	Concentrações de NaCl (mM)					Médias
	0	25	50	75	100	
Número de raízes						
CER	0,333	0,473	0,500	0,047	0,150	0,297 b
CRA	0,619	0,550	0,350	0,286	0,048	0,369 b
SA	1,333	0,714	0,761	0,667	0,809	0,857 a
CV (%)	34,09					
Comprimento de plântula (cm)						
CER	4,004 c	2,895 b	4,030 a	2,762 b	2,171 a	3,252
CRA	7,8762 b	6,943 a	4,740 a	2,967 ab	2,540 a	4,932
SA	10,990 a	6,995 a	6,281 a	5,495 a	3,328 a	6,607
CV (%)	32,15					
Número de folhas						
CER	4,666	3,263	3,900	3,619	3,500	3,802 b
CRA	5,762	3,950	3,950	3,857	3,047	4,116 b
SA	7,952	5,952	5,571	5,095	5,000	5,914 a
CV (%)	24,07					
Número de brotos						
CER	0,381	0,052	0,150	0,190	0,100	0,178 b
CRA	0,000	0,000	0,050	0,047	0,047	0,029 b
SA	1,000	0,333	0,381	0,333	0,476	0,504 a
CV (%)	29,58					
Número de gemas						
CER	5,000	5,000	5,200	3,809	4,250	4,643 b
CRA	6,142	5,650	4,900	3,857	5,523	5,213 b
SA	8,619	8,190	7,095	6,714	5,190	7,161 a
CV (%)	21,71					
Diâmetro de caule (mm)						
CER	1,7614	1,7431	1,5980	1,6819	1,7140	1,6997 b
CRA	1,8376	1,7115	1,834	1,7514	1,9600	1,8190 b
SA	2,5419	2,0609	2,1647	1,9695	1,8890	2,1251 a
CV (%)	39,86					
Massa seca de plantas (g)						
CER	0,0221 b	0,0235 a	0,0281 a	0,0191 b	0,0215a	0,0229
CRA	0,0292 b	0,0206 a	0,0228 a	0,0205 ab	0,0274 a	0,0241
SA	0,0447 a	0,0280 a	0,0297 a	0,0281 a	0,0247 a	0,0310
CV (%)	42,51					

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O comprimento das plantas foi afetado negativamente com o aumento de NaCl. Os acessos SA e CRA comportaram-se de forma linear negativa (Figura 2B). O acesso SA obteve média de altura 9,96cm no tratamento controle, alcançando média de 3,25cm na presença de 100mM. Enquanto que o CRA passou de 8,03cm no tratamento 0mM para 1,85cm na concentração de 100mM de NaCl. O acesso SA destacou-se em todos os tratamentos quando comparado aos demais genótipos utilizados e o CER obteve as menores médias (Tabela 3). A

diminuição do comprimento das plantas é consequência de estresse osmótico grave, equivalente a um estresse hídrico (RADANIELSON et al., 2018) e um desequilíbrio nutricional nas plantas (YUE et al., 2012) causado pela perda na capacidade de transportar ou compartimentalizar Na^+ em níveis não tóxicos à célula (MANABE et al., 2008).

O ajuste osmótico utilizando moléculas orgânicas indicam que as demandas energéticas utilizadas podem restringir as taxas de crescimento em alta salinidade, seja no desvio de carbono ou nitrogênio do crescimento para ao armazenamento, ou em energia gasta no controle do transporte de Na^+ e Cl^- através de membranas (MUNNS & GILLIHAN, 2015).

A mínima de produção foliar ocorreu quando a concentração foi 76,83 mM de NaCl com média de 4,14 folhas por planta (Figura 2C), sendo a maior produção individual do genótipo SA com 5,91 de média geral (Tabela 3). A redução no número de folhas é resultado da diminuição na absorção de água, consequência direta do efeito osmótico causado pela salinidade (GORDIN et al., 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013). Em condições de estresse, alterações morfológicas são necessárias à sobrevivência da espécie, como a redução da transpiração como alternativa para manter a baixa absorção de água salina, sendo possibilitada com a diminuição no número de folhas produzidas (CARRILLO et al., 2014).

O número de brotos é uma das variáveis mais utilizadas para verificar a adaptação ao ambiente *in vitro*. O acesso SA produziu mais brotos em relação aos demais, com média de 0,504 (Tabela 3). A produção de brotos, de forma geral foi menor na concentração 63,57mM quando a média foi 0,13 (Figura 2D). Para o número de gemas, a menor média (3,67) foi obtida na concentração salina de 208,33mM (Figura 2E), com maior produção para o acesso SA em relação aos demais, sugerindo que existem diversas respostas ao estresse salino pelo diferentes acessos, com consequente diminuição na produção de tecidos jovens como brotações e gemas, pois o aumento do potencial osmótico no meio salino afeta a absorção de água e nutrientes prejudicando os pontos de crescimento e expansão celular (SANTOS et al., 2009).

A maior média para diâmetro de caule (2,13mm) foi aferida no acesso SA enquanto houve diminuição nos demais acessos (Tabela 3). A redução nas variáveis de crescimento deve-se a uma diminuição na divisão e alongamento celular (XIONG & ZHU, 2001) ocasionada pelo acúmulo de sais na parede celular, diminuindo o turgor e, consequentemente, o crescimento dos indivíduos (MACÊDO et al., 2005).

As maiores médias de acúmulo de massa seca nos genótipos avaliados foi para o acesso SA nos tratamentos 0 e 75 mM, sendo que nos tratamentos 25 mM, 50 mM e 75 mM não houve diferença estatística entre os acessos (Tabela 3). A menor média de massa seca foi de 0,029 g no tratamento 66,66 mM para o acesso SA e média 0,021 g para a concentração salina de 50 mM no acesso CRA (Figura 2F). Com a diminuição geral nas variáveis de crescimento, a diminuição da massa seca das plântulas torna-se esperado, a partir do incremento de NaCl no meio (CARDOSO et al., 2019). Ocorreu diminuição na produção de biomassa em berinjela sob estresse salino (SILVA et al., 2013) e em banana submetidas à irrigação com água salina (ALMEIDA et al., 2016).

Com o aumento de NaCl, houve diminuição de massa seca de parte aérea e raiz em morango (*Fragaria spp*; Rosaceae), bem como diminuição na sobrevivência entra as cultivares e aumento na concentração de Na^+ no pecíolo e nas folhas das plantas estudadas (FERREIRA et al., 2019). Ao testar diferentes concentrações salinas e adição de fitorreguladores ao meio na micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus*; Bromelioideae), Melo et al., (2011) concluíram que o efeito isolado do NaCl diminui o crescimento e desenvolvimento dos brotos, demonstrado pela redução na altura, número de folhas e gemas. Variáveis biométricas, conteúdo de pigmentos, densidade estomática e a espessura da lâmina foliar de groselha (*Physalis peruviana* L. – Solanaceae) também foram drasticamente reduzidos pelo aumento no teor de sal (REZENDE et al., 2017). Em cultivares de pistache, a salinidade afetou o crescimento e o desenvolvimento das plantas, causando necrose e redução da área foliar, perda de clorofila e redução no comprimento da parte aérea (RAHNESHAN et al., 2018). Em

jenipapeiro também foi verificada uma diminuição no acúmulo de matéria seca sob condições salinas.

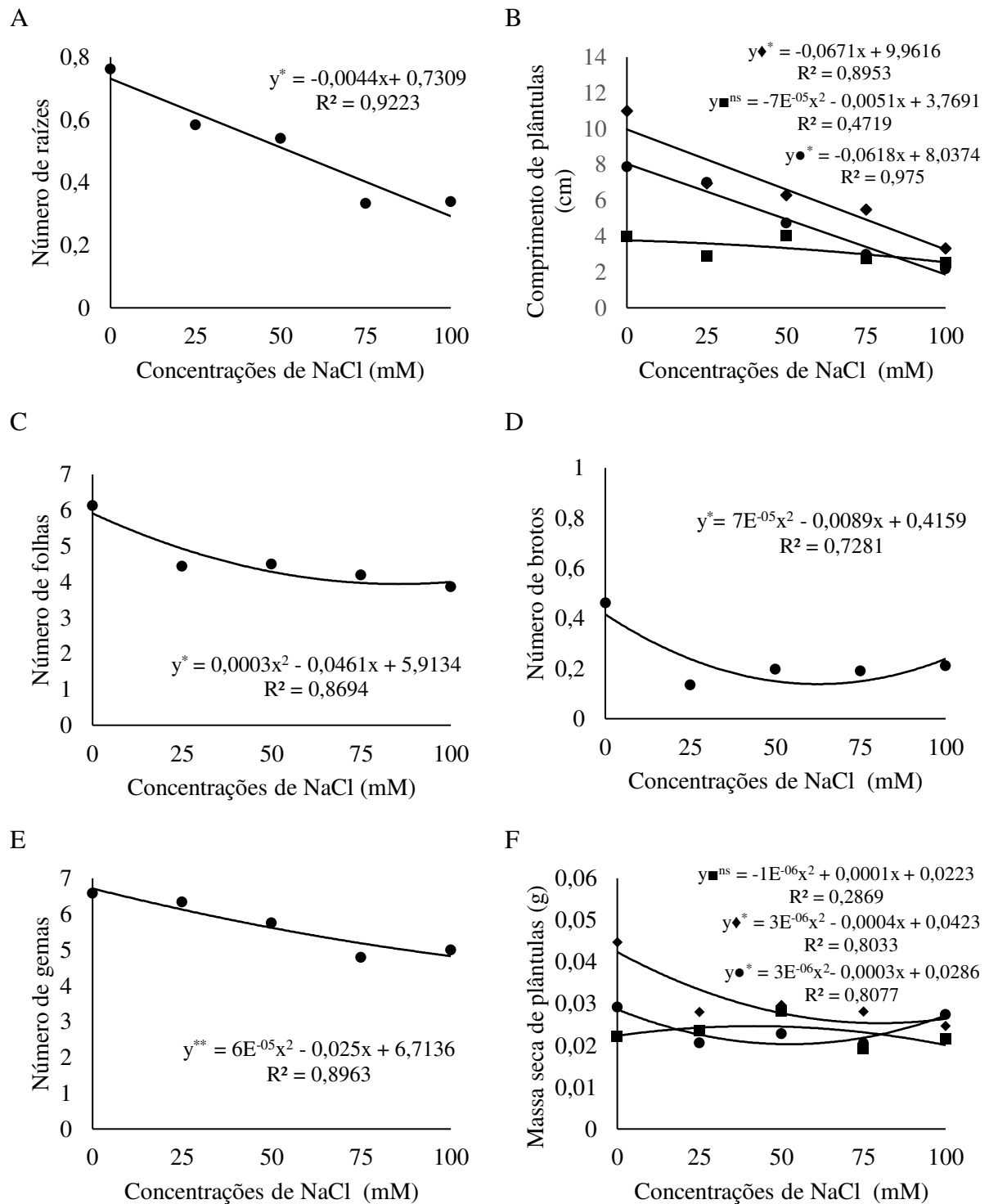


Figura 2. Efeito da salinidade *in vitro* no número de raízes (A), comprimento (B), número de folhas (C), número de brotos (D), número de gemas (E) e massa seca (F) de plântulas de jenipapeiro nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl. ■ Acesso CER; ◆ Acesso SA; ● Acesso CRA.

6.3.4 Efeito da salinidade no conteúdo de prolina

Os três fatores estudados (tempo x concentrações de NaCl x acessos) influenciaram a produção de prolina em explantes de jenipapeiro submetidos a salinidade (ANEXO 6A) ($p < 0,05$).

O acesso CER demonstrou um aumento na produção de prolina nos tratamentos 25 mM ($4,395 \mu\text{m.g}^{-1}$) e 50 mM ($4,370 \mu\text{m.g}^{-1}$) até os 90 dias (Tabela 4), e nos tratamentos mais severos (75 e 100 mM) teve uma maior produção do aminoácido até os 60 dias ($4,475 \mu\text{m.g}^{-1}$ e $4,035 \mu\text{m.g}^{-1}$). Porém, não demonstrou maior tolerância a presença de NaCl, fato relacionado a diminuição no crescimento das plantas.

No acesso CRA houve aumento na produção de prolina nas concentrações salinas de 50 mM ($6,150 \mu\text{m.g}^{-1}$), 75 mM ($6,105 \mu\text{m.g}^{-1}$) e 100 mM ($3,040 \mu\text{m.g}^{-1}$) até 60 dias, porém, aos 90 dias houve diminuição em todas as concentrações de NaCl associada à redução nas variáveis biométricas. No genótipo SA, o tratamento mais severo (100 mM) apresentou as menores médias aos 60 dias ($3,450 \mu\text{m.g}^{-1}$) e 90 dias ($4,260 \mu\text{m.g}^{-1}$), porém quando relacionado aos dados de crescimento, esse acesso se destacou dos demais, podendo ter ocorrido o aumento do consumo da prolina com finalidade de manter as funções fisiológicas da planta.

No tempo 30 dias, o genótipo SA obteve a maior média de produção de prolina no tratamento 100 mM ($5,266 \mu\text{mol.g}^{-1}$) enquanto o genótipo CER teve a menor produção na concentração salina de 70 mM, resultando em $2,39 \mu\text{mol.g}^{-1}$ do aminoácido (Figura 3A). No 60º dia, o ponto máximo de acúmulo de prolina no para o genótipo CRA foi no tratamento salino 34,35 mM com média $6,052 \mu\text{mol.g}^{-1}$, e no genótipo CER a produção mínima ocorreu na concentração salina de 44,14 mM com média de $2,805 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (Figura 3B). Aos 90 dias, o acesso SA obteve menor média ($2,400 \mu\text{mol.g}^{-1}$) na concentração 51,3 mM, enquanto CER teve maior média ($4,673 \mu\text{mol.g}^{-1}$) no tratamento 48,3 mM. No acesso CRA, houve diminuição da produção do aminoácido a partir do aumento de NaCl, passando de $3,846 \mu\text{mol.g}^{-1}$ no tratamento 0 mM de NaCl para $2,206 \mu\text{mol.g}^{-1}$ em 100 mM de NaCl (Figura 3C).

O crescente acúmulo de prolina demonstrou uma osmorregulação natural (OLIVEIRA et al., 2018), pois o acúmulo permite a continuidade dos processos fisiológicos da planta (MARIJUAN & BOSCH, 2013), além de atuarem como osmoprotetores de macromoléculas como proteínas e lipídeos, e substituir a molécula de água nas membranas devido ao caráter hidrofílico (HASEGAWA et al., 2000). Esse acúmulo promoveu a sobrevivência, embora com menores medidas biométricas quando comparados ao tratamento sem NaCl.

A sobrevivência de plantas expostas a estresses abióticos como salinidade pode depender de mecanismos de ajuste osmótico que podem se manifestar pelo acúmulo de íons inorgânicos ou compostos orgânicos (TAIZ & ZEIGER, 2010). Os principais solutos compatíveis acumulados constituem um pequeno grupo de substâncias de natureza química distinta, dentre ele os aminoácidos, como a prolina (BRAY et al., 2000).

O acúmulo de prolina promoveu a sobrevivência e o crescimento dos explantes do acesso SA, fato relacionado a osmotolerância. A prolina pode aumentar em até 100 vezes seu valor em plantas submetidas a estresses quando comparadas a plantas normais, (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008), podendo ser utilizada como marcador para seleção de genótipos tolerantes a salinidade (KHAN et al., 2016).

Os demais acessos apresentaram menores concentrações do aminoácido, podendo a prolina estar relacionada a outro tipo de resposta, pois em baixas concentrações possui papel protetivo (MUNNS & TESTER, 2008).

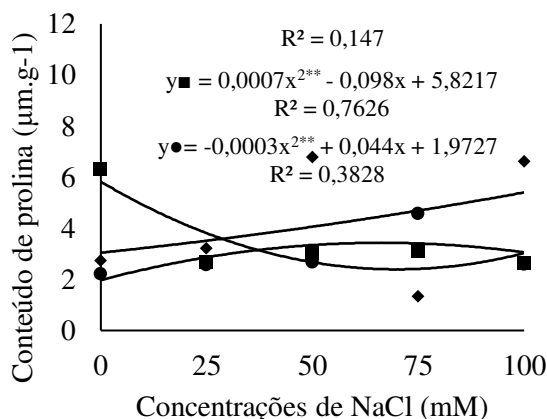
Tabela 5. Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) em acessos de jenipapeiro sob cultivo em meio salino nas concentrações 0; 25; 50; 75 e 100mM de NaCl aos 30, 60 e 90 dias.

Acessos	Dias		
	30	60	90
0 mM NaCl			
CER	6,345 Aa	4,875 Bb	2,245 Cb
CRA	2,225 Cc	5,765 Aa	3,780 Ba
SA	2,745 Cb	4,135 Ac	3,515 Ba
25mM NaCl			
CER	2,665 Bc	1,555 Cb	4,395 Aa
CRA	12,58 Aa	4,895 Ba	3,675 Cb
SA	3,220 Bb	4,410 Aa	2,965 Bc
50mM NaCl			
CER	3,010 Bb	2,975 Bc	4,370 Aa
CRA	2,685 Bb	6,150 Aa	2,575 Bc
SA	6,790 Aa	4,520 Bb	3,090 Cb
75mM NaCl			
CER	3,110 Cb	4,470 Ab	4,030 Aa
CRA	4,570 Ba	6,100 Aa	3,070 Cb
SA	1,350 Bc	4,300 Ab	1,800 Bc
100mM NaCl			
CER	2,620 Bb	4,030 Aa	1,820 Cb
CRA	2,580 Ab	3,040 Ab	2,03 Bb
SA	6,620 Aa	3,450 Ca	4,260 Ba
CV (%)	5,21		

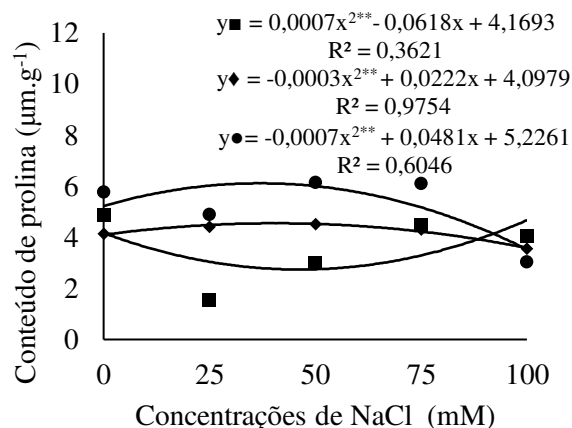
Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey($p < 0,05$).

Em manga, por exemplo, além do aumento do aminoácido foi descrita uma redução nos danos foliares devido à natureza de proteção da prolina (SRIVASTAV et al., 2010). O uso de prolina exógena demonstrou sua eficácia na tolerância à salinidade em cultivares de tomate (KAHLAOUI et al., 2018). O aumento no acúmulo da prolina em plantas submetidas ao estresse salino também foi demonstrado em trigo (AFRIDI et al., 2019), cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2018), banana (HAQ et al., 2011) e caju (FERREIRA-SILVA et al., 2008). Estudos com jenipapeiro, até o momento são inexistentes.

A



B



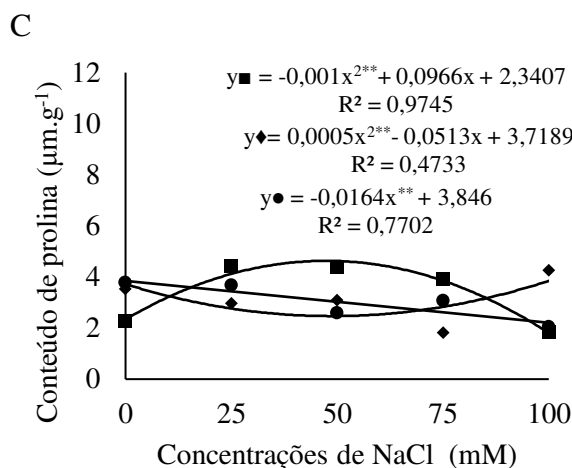


Figura 3. Conteúdo de prolina em acessos de jenipapeiro submetidas ao estresse salino *in vitro* aos 30 (A), 60 (B) e 90 dias (C). ■ genótipo CER; ◆ genótipo SA; ● genótipo CRA.

6.4 CONCLUSÕES

A salinidade afeta o potencial fisiológico das sementes de jenipapeiro na concentração 50mM quando a porcentagem de germinação alcança 40%.

Há aumento significativo na atividade de enzimas antioxidantes SOD e APX em sementes de jenipapeiro sob estresse salino até 288 horas de exposição.

Há redução no crescimento dos acessos testados quando submetidos à solução de NaCl a partir da concentração 50mM.

O acesso SA apresentou maior tolerância ao estresse salino.

Houve incremento no acúmulo de prolina com adição de NaCl ao meio de cultura aos 30, 60 e 90 dias.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRIDI, M.S.; SUMAIRA, A.; MAHMOOD, T.; SALAM, A.; MUKHTAR, T.; MEHMOOD, S.; ALI, J.; KHATOON, Z.; BIBI, M.; JAVED, M.T.; SULTAN, T.; CHAUDHARY, H.J. Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 569-577, 2019.

AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p. 167- 173, 2008.

ALMEIDA, A.M.M; GOMES, V.F.F.; MENDES FILHO, P.F.; LACERDA, C.F.; FREITAS, E.D. Influence of salinity on the development of the banana colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **Revista Ciência Agronômica**. V. 47, n. 3, p. 421-428, 2016.

ALVES, R.C.; MEDEIROS, A.S.; NICOLAU, M.C.M.; PIZOLAT NETO, A.; ASSIS, O.F.; LIMA, L.W.; TEZOTTO, T.; GRATÃO, P.L. The partial root-zone saline irrigation system and antioxidant responses in tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 366-379, 2018.

ANDRÉO-SOUZA, Y.; PEREIRA, A.L.; SILVA, F.F.S.; RIEBEIRO-REIS, R.C.; EVANGELISTA, M.R.V.; CASTRO, R.D.; DANTAS, B.F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-mansô. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2 p. 83-92, 2010.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

BAFEEL, A.O. Physiological parameters of salt tolerance during germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* cultivars of the same subtropical origin. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 300-304, 2014.

BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 147-173, 2011.

BATES, L.S.; WALDRON, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BERNSTEIN, L. Effects of salinity on mineral composition and growth of plants. **Plant Analysis and Fertilizer Problems**, v. 4, p. 25-45, 1964.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. **Responses to abiotic stresses**. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. JONES, R.L. (eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville. American Society of Plant Physiologists, 2000. cap.22, p. 1158-1203.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Embrapa/CNPQ, Colombo, p. 639, 1994.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 49, n. 1, p. 7-17, 2007.

DEL LONGO, O. T.; GOINZ'ZLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 37, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

DEUNER, C.; MAIA, M.S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A.S.; MENEGHELLO, G.E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4 p. 711 - 720, 2011.

EL-DESOUKY, S.A.; ATAWIA, A.A.R. Growth performance of some citrus rootstocks under saline conditions. **Alexandria Journal of Agricultural Sciences**, v. 42, p. 231-254,

FAN, H. F.; DU, C.X.; DING, L.; XU, Y.L. Effects of nitric oxide on the germination of cucumber seeds and antioxidant enzymes under salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 9, p. 2707-2719, 2013.

- FERREIRA, G.E.S.; MATOS, V.P.; SENA, L.H.M.; OLIVEIRA, R.G.; SALES, A.G.F.A. Processo germinativo e vigor de sementes de *Cedrela odorata* L. sob estresse salino. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 99-105, 2013.
- FERREIRA, J.F.S.; LIU, X.; SUAREZ, D.L. Fruit yield and survival of five commercial strawberry cultivars under field cultivation and salinity stress. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 41-410, 2019.
- FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J.A.G.; VOIGT, E.L.; SOARES, L.S.P.; VIÉGAS, R.A. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 51-59, 2008.
- FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L.; GUIMARÃES, V.M.; GONÇALVES, J.F.C.; ATAÍDE, G.M.; BARROS, D.P. atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob diferentes temperaturas. **Cerne**, v. 20 n. 3, p. 401-408, 2014.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GORDIN, C. R. B.; MARQUES, R. F.; MASSETO, T. E.; SOUZA, L. C. F. de. Estresse salino na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de niger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 966-972, 2012.
- HAQ, I.; SOOMRO, F.; PARVEEN, N.; MIRBAHAR, A.A. Certain growth related attributes of micropropagated banana under different salinity levels. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1655-1658, 2011.
- HARTER L.S.H.; HARTE F.S.; DEUNER C.; MENEGHELLO G.E.; VILLELA F.A. Salinidade e desempenho fisiológico de sementes e plântulas de mogango. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 80-85, 2014.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.
- KAHLAOU, B.; HACHICHA, M.; MISLE, E.; FIDALGO, F.; TEIXEIRA, J. Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, p. 17-23, 2018.
- KHAN, A.; ZHAO, X.Q.; JAVED, M.T.; KHAN, K.S.; BANO, A.; SHEN, R.F.; MASOOD, S. *Bacillus pumilus* enhances tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to combined stresses of NaCl and high boron due to limited uptake of Na⁺. **Environmental and Experimental Botany**, v. 124, p. 120-129, 2016.
- KHAN, M.A.; UNGAR, I.A. Germination of the salt tolerant shrub *Suaeda fruticosa* from Pakistan: salinity and temperature responses. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 657-667, 1998.

KHAN, M.H.; PANDA, S.K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 1, p. 81-89, 2008.

LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Série de Biologia: Monografia 24**, 1983.

LIMA, M.G.S.; LOPES, N.F.; MORAES, D.M.; ABREU, C.M. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas a estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.54-61, 2005.

MACÊDO, C.E.C.; BARROSO, P.A.V.; MOURA, G.E.D.D.; ALLOUFA, A.I.A. Efeito do NaCl sobre o crescimento e a multiplicação *in vitro* de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 194-197, 2005.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-77, 1962.

MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S.M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 12, p. 660-666, 2013.

MARSARO, C.C.S.; KESTRING, R.S.; FARIA, R.A.P.G.; VALENTINI, C.M.A. Viabilidade no emprego de diferentes espécies nativas para revegetação da área degradada do IFMT-CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA. **Biodiversidade**, v.13, n.1, p.25-37, 2014.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.A.F.; GOMES, F.P.; AGUILAR, A.G.; MANGABEIRA, P.A.O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, p. 221-231, 2003.

MITTLER, R. **Oxidative Stress, antioxidants and stress tolerance**. Trends Plant Science, v.7, p.405-410, 2002.

MOMENI, A. The geographic distribution of soil salinity levels in Iran. **Iranian Journal of Soil Research**, v. 24, p. 203–215, 2010.

MUNNS, R.; GILLIHAN, M. Salinity tolerance of crops—what is the cost? **New Phytologist**, v. 208, p. 668–673, 2015.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651–681, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.437-497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981

NERI-NUMA, I.A.; PESSOA, M.G.; PAULINO, B.N.; PASTORE, G.M. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271-279, 2017.

NIMBOLKAR, P.K.; KURIAN, R.M.; UPRETI, K.K.; LAXMAN, R.H.; VARALAKSHMI, L.R. Seed germination and seedling growth responses of polyembryonic mango (*Mangifera indica* L.) genotypes to salinity stress. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 2, p. 3641-3648, 2018.

OLIVEIRA, L.A.R.; CARDOSO, M.N.; OLIVEIRA, A.C.A.; MACHADO, C.A.; SANTANA, F.V.; CARDOSO, B.T.; CASTRO, E.M.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S. Biochemical, physiological and growth changes in response to in vitro salinity in sugarcane. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 6, p. 1649-1662, 2018.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MUSQUIM, R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxydative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PINHEIRO, D.T.; SILVA, A.L.; SILVA, L.J.; SEKITA, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; Germination and antioxidant action in melon seeds exposed to salt stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46 n. 3, p. 336-342, 2016.

RADANIELSON, A.M.; ANGELES, O.; LI, T.; ISMAIL, A.M.; GOYDON, D.S. Describing the physiological responses of different rice genotypes to salt stress using sigmoid and piecewise linear functions. **Field Crops Research**, v. 220, p. 46–56, 2018.

RENHE, I.R.T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.)**. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

REZENDE, R.A.L.S.; RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.D.R.; SILVEIRA, H.R.O.; PASQUAL, M.; DIAS, G.M.G. Salt stress and exogenous silicon influence physiological and anatomical features of in vitro-grown cape gooseberry. **Ciência Rural**, v. 48, n. 1, 2017.

RHOADES, J. D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A. M. Uso de águas salinas para a produção agrícola. In: Gheyi HR, Sousa JR & Queiroz JE (Eds.) **Estudos FAO de irrigação e drenagem**. Campina Grande, UFPB, 2000. p.40-48.

RIBEIRO, M.C.C.; MARQUES, B.M.; AMARRO FILHO, J. Efeito da salinidade na germinação de sementes de quatro cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 281-284, 2001.

SAIRAM, R.K.; RAO, L.V.; SRIVASTAVA, G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SANTANA NETA, L.G. **Caracterização e avaliação do potencial de bioativos e atividade antioxidantes de *Genipa americana* L desidratado**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Escola de Farmácia, Salvador, 2014.

SANTO, A.; ORRÙ, M.; SARIGU, M.; UCCHESU, M.; SAL, S.; LALLAI, A.; D'HALLEWIN, G.; BACCHETTA, G. Salt tolerance of wild grapevine seeds during the germination phase. **Scientia Horticulturae**, v. 255, p. 115-120, 2019.

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

SARKAR, A.; GHOSH, P.K.; PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SOREN, T.; PANDEY, S.; MONDAL, M.H.; MAITI, T.K. A halo tolerant enterobacter sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in Microbiology**, v. 169, p. 20-32, 2018.

SECKIN, B.; TURKAN, I.; SEKMEN A.H.; OZFIDAN, C. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, n. 1, p. 76-85, 2010.

SOARES, M.M.; SANTOS JÚNIOR, H.C.; SIMÕES, M.G.; PAZZIN, D.; SILVA, L.J. Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 370-378, 2015.

SOHRABIKERTABAD, S.; GHANBARI, A.; MOHASSEL, M.; MAHALATI, M.N.; GHEREKHLOO, J. Effect of desiccation and salinity stress on seed germination and initial plant growth of *Cucumis melo*. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 833-841, 2013.

SRIVASTAV, M.; KISHOR, A.; DAHUJA, A.; SHARMA, R.R. Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 785-788, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2010. 918 p.

TEH, C.Y.; MAHMOOD, M. SHAHARUDDIN, N.A.; HO, C.L. In vitro rice shoot apices as simple model to study the effect of NaCl and the potential of exogenous proline and glutathione in mitigating salinity stress. **Plant Growth Regulation**, 2014.

TIMASHEFF, S.N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. Pp. 331-334. In: Creighton, T.E. (Ed.), **Protein structure. A practical approach**. Oxford, IRL Press, 1989.

TIMM, F.C.; BANDEIRA, J.M.; BICCA, M.L.; DODE, J.S.; MORAES, M.M. Germinação e crescimento de plântulas de genótipos de aveia branca submetidas ao estresse salino. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 2987-3000, 2015.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 6, n.11, p. 1-23, 2010.

YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D.M.; OZQA, J.A.; AYELE, B.T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 15, p. 1477-1488, 2012.

YARAMI, N.; SEPASKHAH, A.R. Saffron response to irrigation water salinity, cow manure and planting method. **Agricultural Water Management**, v. 150, p. 57-66, 2015.

ZAPPI, D. 2015. *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>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade entre populações nativas de jenipapeiro foi moderada, reforçando a necessidade de estudos mais aprofundados e conservação da espécie em seu local de origem.

Estudo sobre estratégias para aumentar a viabilidade das sementes de jenipapeiro quando submetidas à secagem devem ser aprofundadas, a fim de estabelecer critérios eficientes na conservação a longo prazo, o que viabiliza melhor uso das sementes.

A salinidade afeta a germinação e crescimento inicial de jenipapeiro, tornando o crescimento da espécie restrita a solos menos salinos. Estudos acerca de acessos mais tolerantes ou indução da tolerância na espécie são de suma importância e devem ser realizados com objetivo de domesticação do jenipapeiro e exploração comercial.

ANEXOS

TABELA 1A. Resumo da análise de variância de aspectos germinativos de sementes de jenipapeiro submetidas à secagem.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios		
		TA (%)	VAG	IVG
Tempo de secagem	5	971,77**	0,8408**	0,26*
Resíduo	18	11,35	0,031	0,04
CV (%)		11,57	20,54	22,25

GL: graus de liberdade; TA: Teor de umidade; VAG: Valor angular da taxa de germinação; IVG: Índice de Velocidade de Germinação; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância de caracteres de crescimento de plantas de jenipapeiro oriundas de sementes submetidas à secagem.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		DF ¹	CP	MS	NF	MF
Tempo de secagem	5	21460,11**	254,99**	18,67**	22,31**	527,15**
Resíduo	15	5078,56	10,9595	0,78	0,55	8,86
CV (%)		30,23	8,55	21,51	5,63	16,36

GL: graus de liberdade; DF: Dimensões foliares; CP: comprimento da plântula; MS: massa seca da plântula; NF: número de folhas; MF: massa fresca da plântula; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ¹ Dados transformados em $(X+0,5)^{1/2}$.

TABELA 3A. Resumo da análise de variância de aspectos germinativos de sementes de jenipapeiro submetidas à salinidade.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		VAG	IVE
Tratamento salino	4	0,6601**	1,0289**
Resíduo	15	0,0261	0,0389
CV (%)		24,63	34,83

GL: graus de liberdade; VAG: Valor angular da taxa de germinação; IVG: Índice de Velocidade de Germinação; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 4A. Resumo da análise de variância da atividade de enzimas antioxidantes em jenipapeiro em função do tempo e tratamentos salinos.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios		
		CAT ¹	APX	SOD
NaCl (S)	4	0,14**	0,07	0,10
Resíduo 1	6	0,07	0,02	0,02
Tempo (T)	5	0,27**	0,33**	0,32**
TxS	20	0,16**	0,06**	0,05**
Resíduo 2	24	0,07	0,01	0,003
CV (%)		12,12	20,90	4,03

GL: graus de liberdade; CAT: Catalase; APX: Ascorbato Peroxidase; SOD: Superóxido Dismutase; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ¹ Dados transformados em $(X+0,5)^{1/2}$.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância de caracteres de crescimento em acessos de jenipapeiro cultivadas *in vitro* em função de diferentes tratamentos salinos.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios						
		NR ¹	NF ¹	NB ¹	NG ¹	DC ¹	PF ¹	PS ¹
Acesso (A)	2	9,64**	134,79**	6,16**	180,73**	4,98**	0,21**	0,002*
NaCl (S)	4	2,04*	48,52**	1,01*	38,98**	0,56	0,02*	0,0008*
AxS	8	0,68	4,32	0,50	11,29	0,53	0,02*	0,0005*
Resíduo	294	0,80	6,19	0,32	6,55	0,56	0,006	0,0001
CV (%)		34,09	24,07	29,58	21,71	11,63	5,67	1,04

GL: graus de liberdade; NR: número de raiz; NF: número de folha; NB: número de brotos; NG: número de gemas; DC: diâmetro do caule; PF: peso fresco das plantas; PS: peso seco das plantas; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ¹ Dados transformados em $(X+0,5)^{1/2}$.

TABELA 6A. Resumo da análise de variância do conteúdo de prolina nos acessos de jenipapeiro cultivados *in vitro* em função do tempo de exposição e diferentes tratamentos salinos.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
NaCl (S)	4	3,06**
Acessos (A)	2	6,19**
SxA	8	11,13**
Resíduo 1	15	0,067
Tempo (T)	2	12,23**
TxS	8	4,39**
TxA	4	2,85**
TxSxA	16	8,43**
Resíduo 2	30	0,042
CV (%)	5,25	

GL: graus de liberdade; CV: Coeficiente de Variação. ** Significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade.