



**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 GERMINAÇÃO DE JENIPAPO

RAFAELA SANTOS DE MOURA

2014



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

RAFAELA SANTOS DE MOURA

DIVERSIDADE GENÉTICA E GERMINAÇÃO DE JENIPAPO

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

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Renata Silva Mann
Co-orientadora
Prof^a. Dr^a. Allívia Rouse Carregosa Rabbani

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2014

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

M929d Moura, Rafaela Santos de
Diversidade genética e germinação de jenipapo / Rafaela Santos de Moura;
orientadora Renata Silva Mann. – São Cristóvão, 2014.
67 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal
de Sergipe, 2014.

1. Agrobiodiversidade. 2. Jenipapo - Cultivo. 3. *Genipa americana* L. 4.
Restrição hídrica. 5. Salinidade. I. Mann, Renata Silva, orient. II. Título

CDU: 582.936.1

RAFAELA SANTOS DE MOURA

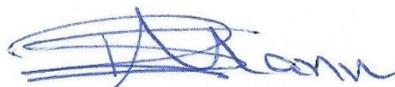
DIVERSIDADE GENÉTICA E GERMINAÇÃO DE JENIPAPO

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

APROVADA em 31 de julho de 2014.

Prof^a. Dr^a. Sheila Valéria Álvares Tavares
UFS

Prof^a. Dr^a. Allívia Rouse Carregosa Rabbani
IFBA



Prof^a. Dr^a. Renata Silva Mann
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais que sempre acreditaram em
mim e me deram apoio e muito amor para eu
seguir em frente.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais Lícia e Robiston pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e respeito. E principalmente por estar ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, e que abriram mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho. Ao meu irmãozinho Rafael que amo tanto.

A Genilson por todo carinho, apoio e incentivo.

À minha orientadora, professora Dr^a. Renata Silva Mann, meu agradecimento especial. Pela paciência, pelos ensinamentos e dedicação dispensados no auxílio à concretização dessa dissertação, além do seu carinho e amizade. Muito Obrigada!

À minha co-orientadora Allívia pela dedicação, confiança depositada, amizade e pelas ricas contribuições e disponibilidade para me ajudar sempre.

À Sheila pela paciência, atenção e disponibilidade de ter me ajudado logo após o seu retorno à Universidade sempre contribuindo com o seu conhecimento e amizade para a realização deste trabalho.

À Aléa, Lícia e Thays amigas e companheiras de curso e de todas as horas. Sem vocês essa trajetória não teria sido tão prazerosa.

A todos que fazem e fizeram parte do grupo Genaplant durante o trabalho, em especial Glauber e Toninho.

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, em especial Jeff e Fran.

À Fernanda e Mariana pela amizade, ajuda e todo apoio que me deram mesmo de longe e que eu sei que posso contar sempre que precisar.

À Universidade Federal de Sergipe, pela oportunidade de realização do curso de Pós Graduação.

Ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Agricultura e Biodiversidade, em especial a professora Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni-Blank pela contribuição com o seu conhecimento.

A Capes pela concessão da bolsa.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão dessa etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.)	2
2.1.2 Importância econômica e utilização	2
2.1.3 Manejo e melhoramento do jenipapeiro	3
2.2 Diversidade genética e Marcadores moleculares	4
2.2.1 Inter Sequências Simples Repetidas - ISSR	5
2.3 Germinação de sementes	7
2.4 Estresse em sementes e plântulas	8
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
5. ARTIGO 1: Diversidade genética de <i>Genipa americana</i> L. utilizando marcador ISSR	19
Resumo	19
Abstract	20
5.1. Introdução	20
5.2. Material e Métodos	21
5.2.1 Material Vegetal	21
5.2.2 Extração de DNA	22
5.2.3 Amplificação de DNA	23
5.2.4 Eletroforese	23
5.2.5 Análises estatísticas	23
5.3. Resultados e discussão	24
5.4. Conclusões	29
5.5. Referências Bibliográficas	30
6. ARTIGO 2: Parâmetros germinativos de <i>Genipa americana</i> L. sob condições de restrição hídrica, salinidade e variações de temperatura	33
Resumo	33
Abstract	34
6.1. Introdução	34
6.2. Material e Métodos	35
6.2.1 Determinação da curva de embebição	35
6.2.2 Condições de restrição hídrica	35
6.2.3 Estresse por salinidade	36
6.2.4 Estresse térmico	36
6.2.5 Variáveis analisadas	36
6.2.5.1 Viabilidade e vigor	36
6.2.5.2 Desenvolvimento e peso seco	37
6.2.6 Análises estatísticas	37
6.3 Resultados e discussão	37
6.3.1 Curva de embebição	37
6.3.2 Restrição hídrica	38
6.3.3 Estresse por salinidade	41
6.3.4. Estresse térmico	44

6.4. Conclusões	47
6.5. Referências Bibliográficas	48
ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
5.1 Mapa do Estado de Sergipe, indicando os municípios onde estão localizados os indivíduos coletados de jenipapo. UFS, São Cristóvão, 2014.	22
5.2 Coeficiente de correlação (r) e número de fragmentos obtidos para os 76 indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. empregando marcadores ISSR. UFS, São Cristóvão, 2014.	25
5.3 Dendrograma baseado no índice de similaridade de Jaccard para os 76 indivíduos de <i>Genipa americana</i> L., utilizando marcadores ISSR. UFS, São Cristóvão, 2014.	27
5.4 Estrutura genética de indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. a partir da análise Bayesiana (STRUCTURE) dos 76 indivíduos coletados do Estado de Sergipe. Cada (n) indica a região de origem dos indivíduos. UFS, São Cristóvão, 2014.	28
5.5 Mapa do Estado de Sergipe, indicando a distribuição genética de acordo com a análise do STRUCTURE dos indivíduos de jenipapo. UFS, São Cristóvão, 2014.	28
5.6 Correlograma do coeficiente de coancestria, por classes de distâncias, para indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. do Estado de Sergipe. UFS, São Cristóvão, 2014.....	29
6.1 Curva de embebição das sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) em água. UFS, São Cristóvão, 2014.	37
6.2 Evolução da porcentagem de germinação em dias para sementes de jenipapeiro (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.	39
6.3 Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.	39
6.4 Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.	40
6.5 Comprimento das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.	40
6.6 Peso seco das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.	41
6.7 Evolução da porcentagem de germinação em dias de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.....	42

6.8	Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.	42
6.9	Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.	43
6.10	Comprimento das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.	43
6.11	Peso seco das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.	44
6.12	Evolução da porcentagem de germinação em dias, em sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.	45
6.13	Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.	45
6.14	Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.	46
6.15	Comprimento das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.	46
6.16	Peso seco das plântulas de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
5.1	<i>Primers</i> ISSR utilizados para estimativa da diversidade genética dos indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. UFS, São Cristóvão, 2014.	23
5.2	<i>Primers</i> ISSR selecionados para estimativa da diversidade genética dos indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. UFS, São Cristóvão, 2014.	24
5.3	<i>Primers</i> de ISSR selecionadas para estimar a diversidade genética dos indivíduos de <i>Genipa americana</i> L. com de locos gerados e a porcentagem de polimorfismo. UFS, São Cristóvão, 2014.	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PEG 600- Polietilenoglicol 6000

NaCl- Cloreto de sódio

CTAB- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DIC- Delineamento Inteiramente Casualizado

ISSR- Inter Simple Sequence Repeats

DNA- acido desoxirribonucleico

PCR- Reação de Polimerase em Cadeia

MOURA, Rafaela Santos de. **Diversidade genética e germinação de jenipapo**. São Cristóvão: UFS, 2014. 66p. (Dissertação– Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

O jenipapo (*Genipa americana* L.) é espécie economicamente importante, e com grande potencial para exploração intensiva, no entanto, faltam informações acerca da distribuição da diversidade genética no Estado de Sergipe, e ainda existem poucas informações sobre o comportamento da germinação das sementes sob condições de estresse. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética para o pré-melhoramento de indivíduos de jenipapo procedentes do Estado de Sergipe, e avaliar o comportamento das sementes submetidas as diferentes condições de estresse. Para avaliação da diversidade genética o DNA genômico foi extraído de folhas jovens de 76 indivíduos adultos de jenipapo, seguindo adaptação do protocolo CTAB 2%, e foi utilizado em reações de ISSR que compunham volume total de 15 μ L. Foram testados 14 *primers*, e sete selecionados devido ao polimorfismo de fragmentos amplificados detectado em géis sob luz UV. O perfil dos fragmentos amplificados foi usado para construção de matrizes binárias, que foram utilizadas para estimativa da diversidade genética. Para os estresses por restrição hídrica e salina, as sementes foram colocadas sobre papel de germinação embebido na proporção de 2,5 vezes o seu peso em cinco potenciais osmóticos (com soluções de polietilenoglicol -PEG 6000 à 0, -0,1, -0,2, -0,3 e -0,4 MPa); e para o estresse salino as sementes foram submetidas à soluções de cloreto de sódio a 0, 25, 50, 100 e 200 mol m^{-3} . Para o estresse térmico as sementes foram germinadas a 15, 25, 30, 35 e 40°C. As sementes também foram avaliadas quanto ao ganho de água durante o processo germinativo e os dados dispostos em curva de embebição. As variáveis analisadas foram porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), desenvolvimento (cm) e o peso seco (PS) de plântulas. A diversidade genética dos indivíduos de jenipapo está distribuída de forma aleatória, independente da região de sua região de origem. E os indivíduos menos divergentes foram os localizados no município de Nossa Senhora do Socorro, sendo estes não indicados para o estudo de pré-melhoramento. As sementes são afetadas quando submetidas a -0,3 MPa e -0,4 MPa. Maiores valores de germinação foram encontrados em 25 mol m^{-3} . A temperatura ótima para a germinação das sementes de jenipapo é 30°C.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., ISSR, restrição hídrica, salinidade, temperatura.

* Comitê Orientador: Profa. Dra. Renata Silva Mann – UFS (Orientadora), Profa. Dra. Allívia Rouse Carregosa Rabbani – IFBA (co-orientadora) e Profa. Dra. Sheila Valéria Álvares Carvalho – PNPd/UFS.

ABSTRACT

MOURA, Rafaela Santos de. **Genetic diversity and germination jenipapo**. São Cristóvão: UFS, 2014. 66p. (Dissertação– Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

Genipap (*Genipa americana* L.) is economically important species, and with great potential for intensive exploitation, however, lack information about the distribution of genetic diversity in the State of Sergipe, and there is little information about the behavior of seed germination under stress conditions. Thus, the aim of this study was to estimate the genetic diversity for pre-breeding individuals coming jenipapo the State of Sergipe, and evaluate the behavior of seeds subjected to different stress conditions. For evaluation of genetic diversity genomic DNA was extracted from young leaves of 76 adult subjects genipap following adaptation of CTAB protocol 2%, and was used in ISSR reactions that made total volume of 15 μL . 14 *primers* were tested seven selected due to the polymorphism detected in the amplified fragments gel under UV light. The profile of the amplified fragments was used to construct binary matrices, which were used to estimate genetic diversity. To the stresses by water restriction and salt, seeds were placed on germination paper soaked in the proportion of 2.5 times its weight in five osmotic potential (with polyethylene glycol PEG 6000 solutions at 0, -0.1, -0.2, -0.3 and -0.4 MPa); Salt stress and the seeds were subjected to solutions of sodium chloride at 0, 25, 50, 100 and 200 mol m^{-3} . For thermal stress, seeds were germinated at 15, 25, 30, 35 and 40 $^{\circ}\text{C}$. The seeds were also evaluated for water gain during the germination process and the data arranged in the imbibition curve. The variables analyzed were germination percentage (G %), germination speed index (IVG), the mean germination time (TMG), germination velodicade average (VMG), development (cm) and dry weight (PS) of seedlings. The genetic diversity of individuals genipap is distributed randomly, regardless of the region of their region of origin. And the less divergent individual's were located in the municipality of Nossa Senhora do Socorro, which are not indicated for the study of pre-breeding. The seeds are affected when subjected to -0.3 MPa and -0.4 MPa. Biggest germination values were found in 25 mol m^{-3} . The optimum temperature for seed germination is 30 $^{\circ}\text{C}$ jenipapo.

Key-words: *Genipa americana* L., ISSR, water restriction, salinity, temperature.

* Advising Committee: Profa. Dra. Renata Silva Mann – UFS (Orientadora), Profa. Dra. Allívia Rouse Carregosa Rabbani – IFBA (co-orientadora) e Profa. Dra. Sheila Valéria Álvares Carvalho – PNP/UFES.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O jenipapo (*Genipa americana* L.) é uma frutífera de grande interesse econômico, tanto pela comercialização dos seus frutos que possuem diversas utilizações (medicinal, alimentícia e cosmética), como pelas suas características madeireiras, muito utilizada na construção civil. No Brasil, principalmente no Nordeste o consumo do jenipapo é bastante comum. Os frutos são coletados de forma extrativista e são encontrados com facilidade em feiras livres e mercados, sendo muito apreciado no consumo *in natura*, em licores e doces. São frutos considerados de grande importância econômica e social, principalmente para famílias classificadas como baixa renda.

A escassez de trabalhos desenvolvidos com essa fruteira associada a exploração de forma extrativista, torna a espécie bastante vulnerável. Com risco de perdas de genótipos com características superiores, para o aproveitamento econômico e possível redução da sua diversidade. Isso ocorre em razão da falta de conhecimento de quem as utiliza, devido a carência de informações sobre os recursos genéticos e da importância de se conservar o germoplasma para assim, melhorar e aumentar a sua produtividade.

Conhecer distribuição da diversidade genética da espécie e entender quais as limitações para a germinação de suas sementes, permite realizar inferências dos limites edafoclimáticos que a espécie suporta para subsidiar um programa de pré-melhoramento. Possibilitando assim, a identificação de quais áreas e espécies são potenciais para exploração e portanto aumento da produção desta espécie.

Uma forma de avaliar a adaptabilidade da espécie frente a condições adversas dos fatores edafoclimáticos é se obter o conhecimento da germinação e desenvolvimento de sementes e plântulas sob condições de estresse. As sementes são notadamente vulneráveis aos efeitos do estresse, principalmente no período da germinação, pois, causam alterações no metabolismo influenciado na redução do vigor e do potencial germinativo podendo levar a morte da semente. Este estresse na germinação pode ser ocasionado pelo excesso ou deficiência de algum fator ambiental, como água, luz, temperatura, salinidade, dentre outros; sendo o conhecimento dos limites exigidos pela espécie um fator determinante para sua sobrevivência. Estes fatores ambientais associados a forma de exploração do jenipapo acarretam na diminuição da diversidade genética da espécie.

Ferramentas como os marcadores moleculares baseados em polimorfismo de DNA permitem estudar a diversidade genética dentro e entre as populações de plantas, distância genética, estudos taxonômicos, filogenéticos e ainda definir estratégias de melhoramento e conservação de germoplasma. Entre as vantagens que apresenta está o fato de não serem influenciados pelo ambiente e serem detectáveis em todos os estádios de desenvolvimento da planta. Os marcadores do tipo ISSR (Inter Sequências Simples Repetidas) são amplamente utilizados nos estudos de diversidade genética por apresentarem elevado polimorfismo, baixos custos, requer pouca infraestrutura laboratorial, apresenta alta reprodutibilidade e não necessita do conhecimento prévio do genoma, ou seja, um *primer* específico.

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética para o pré-melhoramento de indivíduos de jenipapo procedentes do Estado de Sergipe, e avaliar o comportamento das sementes submetidas as diferentes condições de estresse.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Jenipapo (*Genipa americana* L.)

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie de origem pré-colombiana com procedência no norte da América do Sul, sendo também encontrada na América Central, nas Antilhas e no México (SOUZA et al., 1996). Ocorre em áreas com florestas abertas e de vegetação secundária de várzeas situadas em locais temporários ou permanentemente inundados. Com ampla distribuição pelas regiões tropicais úmidas e subtropicais da América Latina desde o México até a Argentina, a espécie parece desenvolver-se melhor em áreas com pluviosidade entre 1.200 a 4.000 mm e com temperaturas médias anuais entre 18 e 28°C (LORENZI, 1992).

A espécie está presente em todo o Brasil, naturalmente ou cultivada, desde a Amazônia até São Paulo e Mato Grosso, em várias formações florestais. De maneira geral, ocorre em regiões próximas ao litoral e as margens dos rios, mas existe também no interior, até o alto Amazonas, em terras elevadas, desde que estas estejam sujeitas a inundações periódicas (BARBOSA, 2008).

Genipa americana L. pertencente à família Rubiaceae, é classificada como espécie secundária tardia (CARVALHO, 1994). É conhecida popularmente como jenipapeiro, jenipa, jenipapinho, janipaba, janapabeiro, janipapo e janipapeiro (LORENZI, 1992).

O jenipapo é uma árvore caducifólia, alta, de copa grande e arredondada, de até 20 m de altura, tronco geralmente reto, casca pouco espessa, lisa, de cor verde acizentada, com diâmetro de 20 a 40 cm, ramificação abundante (MARTINS et al., 2002).

As folhas são curto-pecioladas, opostas, luzidias e as flores são hermafroditas, brancas no princípio e depois se tornam amareladas. Os frutos são do tipo baga subglobosa, de 8 a 10 cm de comprimento e 6 a 7 cm de diâmetro, casca mole, parda ou pardacento-amarelada, membranosa, fina e enrugada (DONADIO et al., 1998).

O fruto é uma baga comestível, de forma, tamanho, cor e peso variáveis. Compõe-se de um involúcro carnoso, de diversas sementes chatas e polidas, recobertas por uma camada polposa adocicada, com casca mole, pardacenta, aromática (SANTOS, 2001).

A propagação de jenipapo é realizada via sementes, e vegetativamente por enxertia por borbulhia e garfagem (DANTAS et al., 2009). Segundo relatos de Vieira & Gusmão (2006) as sementes possuem período de viabilidade relativamente curto, com ausência de germinação após 60 dias de armazenamento, isso ocorre devido a semente do jenipapo ser recalcitrante.

A primeira produção de frutos ocorre por volta dos seis anos após o plantio e os frutos são colhidos diretamente na árvore ou no chão. O ponto de maturidade é percebido quando o fruto muda da coloração verde para marrom. Uma árvore de 15 a 20 anos pode produzir entre 400 a 600 frutos por colheita (BTFP, 2005).

2.1.2 Importância econômica e utilização

A espécie consiste em uma boa opção para os pequenos agricultores, tanto pela madeira como pelos frutos de valor comercial. Também é utilizada na arborização urbana e na medicina popular (COSTA et al., 2005). Na produção de cosméticos, tinturas, carvão e para fins madeireiros, ornamentais e alimentícios (SALOMÃO & PADILHA, 2006).

A principal forma comercial do jenipapeiro é o fruto, que após a maturação fornece polpa comestível aproveitada *in natura* e na forma de doces; o suco fermentado transforma-se em vinho ou licor (LORENZI, 2000). Apresenta grande demanda por parte do mercado de frutas frescas, por se tratar de uma fruta saborosa, pouco perecível e com excelentes qualidades nutricionais. Seus frutos são explorados no Estado de Sergipe para comercialização, principalmente para o consumo *in natura* e são encontrados facilmente em feiras livres e mercados (SANTOS, et al., 2007). São frutos de considerável importância econômica e social, principalmente para famílias de baixa renda (COIMBRA et al., 2006).

Na cultura popular o jenipapo tem indicações medicinais e, em alguns lugares, é considerado afrodisíaco. Sua polpa é usada contra icterícia, afecções do estômago, baço e fígado. Existem relatos de que a goma extraída do tronco desta frutífera tem efeito anti-diarréico e propriedades antigonorréicas. O chá de suas raízes é utilizado como purgativo; as sementes esmagadas como vomitório; o chá das folhas como anti-diarréico; o fruto verde ralado é utilizado contra asma; as brotações são desobstruinte; e o suco do fruto maduro é tônico para estômago e diurético (SANDRI, 1998; EPSTEIN, 2001). O chá da casca apresenta efeito diurético e é usado no processo de emagrecimento (NETO, 2006).

A madeira é empregada na construção civil, marcenaria, na confecção de móveis, cabos de ferramentas e para carpintaria em geral. A casca é usada em curtumes para tratar couros por ser rica em tanino. Seus frutos, comestíveis, quando ainda verdes fornecem um corante de cor azulada que é utilizado para diversas finalidades. Esta propriedade já era bem conhecida pelos índios que os utilizavam para tingirem tecidos, enfeites, cerâmicos e para pintar o corpo nas cerimônias religiosas e durante as batalhas. Este poder corante é devido à presença de um iridoide denominado genipina, que se apresenta originalmente incolor, mas que quando exposto ao ar ou em contato com as proteínas da pele torna-se azul escuro e finalmente preto. Para extrair o corante do fruto, este deve ser cortado imaturo, espremido e depois o suco coado. A genipina é incolor no início da frutificação e perde o efeito corante com o amadurecimento do fruto (LORENZI, 2000; MORS et al., 2000; DELPRETE et al., 2005).

Em 2011 foi patenteado um corante azul proveniente de *Genipa americana* (MX2011003234), que é derivado a partir de um suco bruto obtido da polpa do jenipapo e misturado com glicina (líquido) ou com glicina mais amido (em pó). Esse corante pode ser aplicado na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosméticos e outras indústrias. Também foi patenteado nesse mesmo ano o extrato de jenipapo (MX2011009851) para obtenção de uma substância insolúvel em meios polares e não polares, para aplicação em cosmético, fármacos, tecidos, tintas, vernizes e composições alimentares (ESPACENET, 2014).

Outra forma de utilização da espécie é em programas de reflorestamento de áreas para preservação permanente e reservas legais pelos agricultores (VALERI et al., 2003). Segundo Melo et al. (2004) utilizar espécies nativas na recuperação de áreas degradadas é uma prática relativamente recente e tem sido motivo de muitos estudos relacionados primordialmente à seleção de espécies aptas a revegetar com sucesso este tipo de ambiente.

Silva & Correa (2008) relataram que o jenipapeiro começou a ser utilizado em projetos de revegetação de áreas mineradas no Distrito Federal há menos de uma década, e tem demonstrado um excelente desempenho.

Considerando o alto potencial do jenipapeiro, alguns órgãos de pesquisa registram a existência de acessos provenientes de sementes ou vegetativamente de jenipapo em bancos de germoplasma, como a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal (SP); a Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, em Cruz das Almas (BA); e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A. (EBDA), em Conceição do Almeida (BA) (DANTAS et al., 2009). A Embrapa Tabuleiros Costeiros mantém um BAG de Jenipapeiro desde 2009, com 172 acessos de jenipapo oriundos de diversas regiões do país (SILVA, et. al., 2013).

2.1.3 Manejo e melhoramento do jenipapeiro

A exploração do jenipapeiro é predominantemente extrativista, feita por pequenos agricultores tradicionais e proprietários da terra, sem tecnologia e tratos culturais, garantindo, assim, empregos no mercado informal (ROCHA, 2006; DANTAS et al., 2009).

A escassez de informações da espécie associada à exploração extrativista torna a espécie bastante vulnerável, com risco de perdas de genótipos com características superiores, para aproveitamento econômico e também acarreta em uma possível redução de sua diversidade (SOUZA, 2007).

O extrativismo acarreta em uma fragmentação florestal, onde ocorre a redução e isolamento da vegetação natural. Com isso, sobrevém a diminuição da variabilidade genética inter e intrapopulacional, aumentando assim o cruzamento de indivíduos aparentados, o que compromete a evolução natural das espécies e reduz a capacidade de adaptação das mesmas às mudanças ambientais (YOUNG & BOYLE, 2000).

Uma alternativa promissora para a condução de programas de melhoramento é a execução das atividades com o pré-melhoramento. A atuação conjunta com pesquisadores especialistas em pré-melhoramento possibilita a supressão de etapas, pela utilização de material já caracterizado e trabalhado na mesma direção dos propósitos do programa de melhoramento genético (TOMBOLATO et al., 2004).

A condução de pesquisas envolvendo atividades como caracterizações agronômicas e moleculares, assim como informações sobre o comportamento da espécie no seu habitat natural torna-se de extrema relevância uma vez que, a partir destes resultados, é possível avaliar a existência de variabilidade genética na espécie, e indicar indivíduos para exploração imediata ou para futuros trabalhos de melhoramento. A melhoria na produtividade da germinação sob condições de estresse é possível e iniciativas de melhoramento têm tornado isso viável, especialmente se projetos locais combinarem esforços de melhoramento genético com melhorias no manejo das propriedades. A qualidade dos produtos em sistemas de agricultura local é muito importante e o melhoramento enfoca esse aspecto, buscando atingi-lo antes mesmos que outros caracteres relacionados ao rendimento sejam considerados (MACHADO & FERNANDES, 2001; MORRIS & BELON, 2004; CHIFFOLEAU & DESCLAUX, 2006; DAWSON & MURPHY, 2008).

O manejo dos recursos vegetais associado ao melhoramento, desempenham um papel relevante para os agricultores familiares, principalmente em regiões com condições ambientais, climáticas e econômicas adversas, pois, tendo o conhecimento do comportamento das sementes em diferentes condições pode auxiliar no plantio em locais favoráveis e assim, aumentar a produção e produtividade do jenipapeiro. Além, de contribuir para a construção de um ambiente agrícola sustentável, com a elevação de renda e agregação de valores ambientais e sociais, criando as bases para a soberania alimentar das comunidades, que passam a ter autonomia sobre a produção das sementes (MACHADO, 2007).

2.2 Diversidade genética e Marcadores moleculares

A diversidade genética é um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie em médio e longo prazo, já que é por conta dela que uma espécie está apta a se adaptar às constantes modificações do meio ambiente (RODRIGUES, 2009). Uma ferramenta útil para mensuração da diversidade genética são os marcadores moleculares. Um marcador genético pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso (proteínas e caracteres morfológicos) ou de um segmento específico de DNA, cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas e possuem comportamento de acordo com as leis de Mendel (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os parâmetros utilizados para quantificar a variabilidade genética em germoplasma vegetal têm sido as estimativas de divergência entre e dentro de populações e, ou acessos, por meio das frequências gênicas e genotípicas, a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada. Estes estudos fornecem importantes subsídios para o conhecimento da variabilidade dos acessos e possibilitam melhor gerenciamento de bancos de germoplasma, facilitando a identificação de genitores adequados para a formação de populações com ampla base genética (CRUZ et al., 2003; SUDRÉ et al., 2005).

A tecnologia dos marcadores moleculares oferece a possibilidade ao melhorista de acessar o genótipo da planta ao invés de simplesmente o fenótipo, como normalmente ocorre. Em razão de o fenótipo ser a expressão do genótipo, sob condições ambientais específicas, este pode mudar com o ambiente. No entanto, o genótipo, ou a constituição do DNA de um indivíduo permanece constante durante todo o seu ciclo de vida (OLIVEIRA et al., 2007).

O estudo genético de *Genipa americana* L., a partir da análise de eletroforese de isoenzimas permitiu estimar a autocorrelação espacial e a sua correlação com a estruturação das populações, que estatisticamente foi significativa dentro da população (SEBBENN, 1998).

Os marcadores moleculares de DNA são seqüências genômicas, por meio das quais, pode-se caracterizar um fenótipo, e podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas (SOUZA et al., 2008). Esses marcadores são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente da diferenciação ou do estágio de desenvolvimento do organismo, e não sofrem influência do ambiente e dos efeitos pleiotrópicos (múltiplos efeitos resultantes de um único gene) e epistáticos (interações gênicas) (JOSHI et al., 2004; AGARWAL et al., 2008).

Um bom marcador molecular deve apresentar como características principais elevado polimorfismo, capacidade de distinção entre indivíduos homo e heterozigóticos, ter grande frequência e distribuição no genoma, facilidade de detecção, ser econômico e apresentar alta reprodutibilidade, entre outros. Como não existe ainda um só marcador que apresente todas estas características (KUMAR et al., 2009), assim a escolha do marcador apropriado vai depender de uma série de fatores, como: a) conhecer bem, na teoria e prática, os vários tipos de marcadores moleculares e suas vantagens e desvantagens, incluindo suas adaptações e modificações; b) verificar os marcadores que estão disponíveis para a espécie a ser estudada; c) conhecer bem a espécie em estudo quanto à sua base genética, seu modo de reprodução e sua evolução; d) avaliar a disponibilidade de estrutura física, recurso financeiro, recurso humano e equipamentos; e) analisar o objetivo do trabalho que será realizado, pois as características dos marcadores podem ser vantajosas ou desvantajosas em função da finalidade do trabalho (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Há diversos tipos de marcadores moleculares, como os RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), AFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados), RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único), EST (etiquetas de seqüências expressas), CAPS (Polimorfismo de seqüência amplificada e clivada), SSR (Seqüência simples repetida) e ISSR (Inter seqüências simples repetidas). A seleção de um ou mais marcadores requer o conhecimento de suas propriedades e aplicações, pois não existe um marcador que seja ideal para todas as situações, dependendo, assim, dos objetivos pretendidos da análise (SEMAGN et al., 2006).

2.2.1 Inter Sequências Simples Repetidas - ISSR

Os ISSRs são um tipo de marcador genético que nos permite obter os níveis de variação em regiões microssatélites que estão espalhadas em vários genomas. Essas regiões consistem de repetições em tandem de razões simples como $(CT)_n$ ou $(CA)_n$, localizado entre as seqüências não repetitivas do genoma nuclear eucariótica. As razões repetidas, também chamados de SSRs (Simple Sequence Repeat) pode ser penta-, tetra-, tri- e dinucleotídeos (ZIETKIEWICZ et al. 1994).

O comprimento das seqüências de microssatélites tende a ser altamente variável entre os indivíduos, devido a altas taxas de mutação, porque quando o DNA está replicado durante meiose, a DNA polimerase pode “mover-se” para a frente ou para trás nas unidades que se repetem por remoção ou adição de unidades de cadeia. As cadeias resultantes podem então ter menos ou mais unidades repetição (ou pares de bases) de cadeias parentais (WOLFE, 2005).

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Inter Repetições de Seqüência Simples) foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie-alvo (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2006) e de eliminar algumas desvantagens que outros marcadores apresentam (TERZOPOULOS et al., 2005).

O método ISSR tem sido amplamente utilizado por ser uma técnica simples, rápida, eficiente, possuir alta reprodutibilidade, gera altos índices de polimorfismo e não necessita do

conhecimento prévio do genoma, desenho do *primer* (REDDY et al., 2002). São facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (WOLFE, 2005). Os *primers* desenvolvidos para ISSR podem ser degenerados – $(CA)_n$ TY; $(CA)_n$ RG, onde Y representa uma base pirimidina, C ou T, e R uma base purina, G ou A; ou podem ser uma sequência do próprio motivo $(CA)_n$ com número variado de repetições. Atualmente estes marcadores têm apresentado alto conteúdo de informações, mostrando-se eficazes nas análises de diversidade genética (LIAO et al., 2012), entretanto, possuem a desvantagem de serem marcadores dominantes (ZIETJIEWICZ et al., 1994).

ISSR é considerado um marcador semi-arbitrário, baseado no princípio da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), e envolve ampliações de segmentos de DNA, em presença de *primers* complementares (SOUZA et al., 2005).

Os *primers* podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou existe uma deleção ou inserção, o que modifica a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora ISSR sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar locos múltiplos em uma única reação (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001).

A diversidade genética de 35 acessos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) plantados no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Curz da Almas), foi avaliada por meio de 22 *primers* do marcador ISSR. Constatou-se que os marcadores moleculares baseados em ISSR são ferramentas eficazes para avaliar a variabilidade genética da espécie *Genipa americana* L., onde foi observado a formação de três grupos desses 35 acessos. E também que os *primers* utilizados na genotipagem dos acessos de jenipapeiro, apresentam boa amplificação, repetibilidade e polimorfismo no DNA genômico da espécie; (SANTOS, 2012).

Em *Carapichea ipecacuanha* (ipecac), da mesma família botânica do jenipapo, tem sido comprovada a importância medicinal. No entanto, tem-se constatado o declínio das populações, para a qual falta proteção legal. Estudo com 89 marcadores ISSR, indicam que a espécie necessita de proteção legal, uma vez que está sofrendo perda da diversidade genética (OLIVEIRA et al. 2010).

Em *Morinda* spp., outra Rubiaceae, os marcadores ISSR foram úteis para avaliar a diversidade entre acessos (SINGH et al. 2011).

Marcadores ISSR foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre oito espécies de *Coffea* e para identificar o grau de parentesco de seis híbridos interespecíficos. Um total de 14 *primers* permitiram a estimativa da diversidade genética para agrupar as espécies e híbridos. Altos níveis de variação genética foram revelados. O dinucleotídeo com motif (GA)₉T combinado com outros di- tri- e tetra-nucleotídeos produziu um maior número de fragmentos, a maioria deles polimórficos, sugerindo uma alta frequência de motifs poli GA (RUAS et al. 2003).

Populações de *Psychotria hastisepala* de sete fragmentos de tamanhos variando de 4,1 a 168,7 hectares, de um total de 91 plantas foram investigadas. Para avaliar o sucesso reprodutivo, foram quantificados frutos e a produção de sementes sob polinização natural, para avaliar a diversidade genética e a estrutura da população. Não houve associação entre a produção de sementes e tamanho do fragmento. Níveis de diversidade genética foram positivamente associadas com o número de plantas por fragmento, mas não estavam relacionados a morfologia floral. AMOVA mostrou que cerca de 65% de toda a variação genética era atribuída a diferenças entre plantas dentro dos fragmentos. Portanto, as populações de *P. hastisepala* estavam suscetíveis ao declínio (SILVA et al. 2014).

Estudos e análises da diversidade genética usando diferentes marcadores resulta em polimorfismo de bandas, informação sobre o índice de Shannon e outras ferramentas que auxiliam no entendimento da variabilidade genética de espécies dentro e entre populações. A diversidade genética de espécies endêmicas, espécies com estreito endemismo e ameaçadas podem ser conservadas *ex situ* e *in situ*. A preservação de germoplasma, banco de sementes, banco de genes e o desenvolvimento e manejo sustentável pode também ser alcançado com o apropriado uso da diversidade genética (SAEED & BAROZI 2012).

2.3. Germinação de sementes

Devido ao acelerado processo de fragmentação que os ecossistemas naturais vem sofrendo, com isso algumas espécies tem apresentado dificuldade de se estabelecer em campo, seja pela ausência ou presença excessiva de um determinado fator. Que acaba dificultado a germinação das sementes e em consequência o desenvolvimento das plantas. A germinação de sementes consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma sequência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo se dá pela absorção de água pelas sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário. Para que a germinação ocorra satisfatoriamente, a semente deve dispor de condições favoráveis do ambiente (BEWLEY & BLACK, 1994).

Uma primeira etapa, condição *sine qua non* é a ocorrência de embebição das sementes. A velocidade de embebição depende das características de cada espécie, dentre essas, da composição química e da permeabilidade do tegumento. A embebição é fundamental para a germinação porque permite a retomada da atividade metabólica, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento subsequente (ALBUQUERQUE et al., 2009).

O padrão de germinação de sementes na maioria das vezes é trifásico. Na fase I denominada embebição passiva, ocorre à absorção de água pela semente, sendo um processo rápido devido à diferença de potencial matricial dos diversos tecidos que as compõem. Esta etapa ocorre em sementes viáveis, mortas ou dormentes. Na fase II conhecida como estacionária, a semente absorve pouca água, no entanto, ocorre transporte ativo do tecido de reserva para o tecido meristemático, visto que o potencial osmótico e o potencial de pressão são semelhantes. E a fase III caracteriza-se pela retomada de absorção de água e protrusão da radícula. As causas possíveis para o crescimento do embrião são o baixamento do seu potencial osmótico (ϕ_0), assim o aumento do potencial de pressão (ϕ_p) na parede da radícula; relaxamento da parede celular da radícula; e enfraquecimento dos tecidos ao redor do embrião, ou a combinação destas causas (BEWLEY & BLACK, 1994). A germinação é caracterizada como um processo irreversível, sendo um dos estados mais delicados durante o ciclo de vida da planta.

Queiroz (2009) em seu estudo com germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) observou que a curva de embebição segue o padrão trifásico, e constatou que as sementes estudadas protudiram a radícula a partir do décimo oitavo dia (432 horas). Já para SOUZA et al. (1999) e ANDRADE et al. (2000) a protrusão da radícula das sementes de jenipapo ocorreu de 8 a 13 dias após o início da embebição.

Sementes de café (*Coffea arabica*), também pertencem a família Rubiaceae como o jenipapo, apresentam germinação lenta e não uniforme porque o endosperma micropilar apresenta resistência à expansão e alongação a expansão embrio radicular (SILVA et al. 2004).

As sementes de jenipapo apresentam emergência de plântulas após 70 dias (ANDRADE et al., 2000), o que reflete a dificuldade em se obter testes rápidos para detecção da viabilidade nesta espécie. Além disso, algumas espécies tem dificuldade de se desenvolver em ambientes diferentes dos quais vivem. Sendo assim, um dos grandes problemas enfrentados pelas culturas e as espécies de maneira geral, refere-se à dificuldade de

estabelecimento em campo, sendo a quantidade de água disponível, um dos fatores que influenciam no desenvolvimento inicial e posterior das plantas (SANTOS, 2010).

A evolução das plantas levou ao desenvolvimento de estratégias adaptativas para lidar com estresses ambientais, estas são acionadas por algum estímulo externo, sendo a resposta fisiológica proporcional a este estímulo, evitando desperdício de energia na ausência do estresse. As células vegetais têm evoluído mecanismos distintos para perceber sinais do ambiente e integrá-los, para modular a expressão dos genes necessários para responder em conformidade com o estresse (TORRES et al., 2007).

2.4. Estresse em sementes e plântulas

A temperatura, disponibilidade de água e luz são fatores ambientais que influenciam, consideravelmente, o processo de germinação, sendo que a quantidade desses fatores varia de acordo com as espécies e cultivares (MENESES, 2007).

Estudar a germinação de sementes sob diferentes condições de estresse, causadas principalmente pela alteração dos ecossistemas naturais devido a ação antrópica do homem é importante para que se possa determinar o limite de resistência destas, frente às diferentes condições adversas (AZERÊDO, 2009).

A água é um dos fatores mais importantes, uma vez que desencadeia o processo de germinação e está envolvida, direta ou indiretamente em todas as outras fases subsequentes do metabolismo da planta, e atua amolecendo o tegumento das sementes favorecendo a penetração do oxigênio (STEFANELLO et al., 2006).

O estudo da germinação de sementes sob diferentes condições ambientais ou estresse hídrico tem grande importância prática, pois muitas vezes, as sementes e mudas, podem passar por períodos de limitação na disponibilidade de água. Assim, a restrição hídrica, por exemplo, contribui para a diminuição da velocidade de germinação das sementes, sendo que para cada espécie existe um valor de potencial hídrico no solo, abaixo do qual a germinação não ocorre. Potenciais hídricos muito negativos, especialmente no início da embebição, influenciam a absorção de água pelas sementes, podendo inviabilizar a sequência de eventos do processo germinativo (AZERÊDO, 2009).

O polietilenoglicol (PEG) é um dos produtos que têm sido utilizados com sucesso em trabalhos de pesquisa para simular a restrição hídrica nas plantas, uma vez que tem a vantagem de ser inerte, não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez. A desvantagem é que não permite aeração uniforme na solução, quando utilizado como solução em condições de imersão de sementes, apresenta certa dificuldade de remoção após o tratamento e é produto de custo elevado (NASCIMENTO, 2004).

Em trabalho com *Genipa americana* L., observou-se que a imersão em soluções de PEG 6000 com potencial de -0,3 MPa permite condicionamento osmótico, enquanto com -0,4 MPa a interferência se dá com resposta no vigor das sementes. A restrição hídrica utilizando sementes embebidas em papel com a solução osmótica reduz a germinação em função do tempo, cessando nos potenciais de -0,3 e -0,4 MPa (SANTOS et al., 2011).

Sementes da espécie agrícola *Glycine max* L. Merrill conhecida como soja, quando submetidas ao estresse hídrico utilizando PEG-6000 com potenciais de -0,1 e -0,2 MPa tem sua qualidade fisiológica afetada, e no potencial de -0,2 MPa o hipocótilo é mais afetado do que a radícula (PEREIRA, 2013).

A utilização do PEG-6000 no estresse hídrico, em sementes florestais de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) apresentam desempenho germinativo satisfatório até o potencial de -0,5 MPa, mas uma redução significativa nesse parâmetro ocorreu a partir de -1,0 MPa onde não houve germinação (MOURA et al., 2011).

Com sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum*), que utilizou solução de polietilenoglicol (6000) para a restrição hídrica nos potenciais de -0,4 e -0,5 MPa houve inibição da germinação (BRAGA et al., 2008).

Desta forma, a restrição hídrica promovida por PEG restringe a germinação que pode variar entre as espécies. Esta restrição ainda pode promover uma embebição lenta e controlada favorecendo os processos germinativos, agindo assim, como um processo pré-germinativo que contribui para uniformizar a germinação posterior em água. No entanto, alguns potenciais podem ser considerados críticos para a germinação por causar restrição hídrica (KAYA et al., 2006).

As bases moleculares de tolerância ao estresse estão sendo estudadas, e alguns genes já foram induzidos por meio do estresse hídrico em plantas, como exemplo temos *Arabidopsis thaliana* (VERSLUES, 2006).

Em jenipapo existem evidências do comportamento de genes relacionados a germinação, o que sugere que uma isoforma específica da enzima está envolvida com o enfraquecimento do endosperma, o que facilita a protrusão da radícula (QUEIROZ, 2012).

Outro tipo de estresse que afeta a germinação e qualidade da muda em campo, é o estresse salino que está relacionado aos diferentes sais existentes no solo, que podem afetar a germinação, e a depender do nível, podem apresentar efeitos diferentes sobre a germinação das sementes (DUAN et al., 2004).

Os efeitos do estresse salino moderado limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas e a produtividade das culturas, mas em casos extremos pode levar à planta a morte (SOBHANIAN et al., 2011). Geralmente esse estresse desencadeia algumas reações comuns, que levam a desidratação celular, com simultâneas alterações osmóticas, além de diminuição dos volumes citosólico e vacuolares (WANG et al., 2009). Assim, ocorre um déficit hídrico na planta, com redução na taxa de fotossíntese levando a um estresse oxidativo, que tem um efeito negativo nas estruturas e metabolismo celulares (WANG et al., 2009; SOBHANIAN et al., 2011).

No Nordeste brasileiro, os solos afetados por sais naturalmente ocorrem devido a irrigação mal conduzida e/ou com águas de qualidade duvidosa, sendo um dos inconvenientes da irrigação salinizar o solo. Isso ocorre pelo fato da água de irrigação apresentar sais dissolvidos que, mesmo em baixa concentração, podem ser incorporados ao solo, o qual pode se tornar salino em poucos anos (MEDEIROS, 2001).

Os solos salinos (CE maior que $4,0 \text{ dS m}^{-1}$) apresentam uma concentração de sais suficientemente alta para reduzir o crescimento da maioria das espécies vegetais (FLOWERS, 2004). Segundo Netto et al. (2007) os solos do perímetro irrigado do Estado de Sergipe encontram-se com um nível de salinidade acima de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, que caracteriza como risco iminente para a produção satisfatória das culturas em geral.

As respostas ao estresse salino variam amplamente dependendo do genótipo da planta. Com base em sua resposta a salinidade, as plantas podem ser divididas em dois grupos. No primeiro grupo, estão as halófitas, são nativas de solos salinos e completam seu ciclo de vida nesses ambientes. No segundo grupo estão as glicófitas ou não-halófitas que possuem menor tolerância à salinidade que as halófitas. Existe um limiar de concentração salina acima da qual as glicófitas começam a mostrar sinais de inibição do crescimento, descoloração foliar e perda de massa (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Uma característica importante das plantas halófitas, que as distinguem das glicófitas é a de possuir sementes que permanecem dormentes, sem perda de viabilidade, em altas concentrações salinas, e depois, germinam prontamente quando a concentração do meio é reduzida (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Muitas halófitas apresentam mecanismos de exclusão de Na^+ e Cl^- em estruturas morfológicas como glândulas secretoras e pêlos vesiculares (FERNANDES et al., 2010).

Em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), a concentração de 25 m mol^{-3} de NaCl apresentou a maior porcentagem de germinação (81%), e a partir de 50 m mol^{-3} houve decréscimo da germinação até o tratamento com 250 m mol^{-3} (22%) (RABBANI et al., 2013).

O atraso no processo germinativo em sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) foi de 11 dias, quando submetidas à condição de estresse salino na fase de embebição; e há

redução no crescimento das plântulas quando submetidas à solução de cloreto de sódio (NaCl) com condutividade elétrica de 6 dSm^{-1} (ANDRÉO-SOUZA, et al., 2010).

A sensibilidade de germinação foi comprovada em trabalho com sementes de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) submetidas ao estresse salino. Esta sensibilidade ocorreu aos níveis salinos iguais ou superiores a 100 mol m^{-3} e se desenvolvem bem com 25 e 50 mol m^{-3} (SANTOS et al., 2011).

O estresse salino ocasionado por NaCl até o potencial de $4,5 \text{ dS m}^{-1}$ não afeta o desempenho germinativo de árvore-de-seda (*Chorisia glaziovii* O. Kuntze) e as sementes desenvolveram elevada tolerância à salinidade (GUEDES et al. 2011).

Um aspecto de grande relevância a ser tratado é a importância de se identificar a tolerância de plantas a salinidade, e seu potencial uso na fitoremediação. Fitorremediação é a combinação da palavra grega *phyton*, que significa planta com a palavra latina *remediare*, que significa um sistema no qual plantas agem conjuntamente com organismos do solo e podem transformar contaminantes em formas menos tóxicas. Nesta situação as plantas que toleram tais condições podem ser úteis para se tentar restabelecer plantios em áreas salinizadas, ao invés de abandoná-las.

Outro fator também muito importante que altera o desempenho da germinação e o desenvolvimento das plantas é a temperatura. A temperatura provoca efeitos variáveis entre as sementes de espécies diferentes, onde a temperatura ideal de germinação média é dependendo da genética, dependendo da morfologia de sementes e fisiologia. Esse fator também atua diretamente na velocidade de absorção de água e as relações bioquímicas que ocorrem durante a germinação (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

A temperatura no processo de germinação varia com relação às espécies, sendo definida geneticamente e, também, em função das condições fisiológicas das sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). A maioria das sementes estão inicialmente dormentes em frutos. Sementes secas continuamente perdem a dormência a uma taxa dependente de temperatura. Sementes hidratadas respondem diferencialmente, e altas temperaturas reforçam ou podem induzir a dormência. Baixas temperaturas podem também induzir dormência em algumas circunstâncias, mas em muitas espécies ela é estimulada (resposta à estratificação), especialmente dentro de uma faixa de $-1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Sendo assim, a temperatura pode afetar o processo germinativo de três maneiras distintas: sobre o total de germinação, sobre a velocidade de germinação e sobre a uniformidade de germinação. A germinação só ocorrerá dentro de certos limites de temperatura: acima ou abaixo dos limites superior ou inferior, a germinação não ocorrerá. Portanto, a temperatura ótima é aquela que possibilita a combinação mais eficiente entre a porcentagem e a velocidade de germinação (MARCOS, 2005).

Em jenipapo (*Genipa americana* L.), a maior germinação das sementes foi encontrada nas temperaturas de 25°C (90%), 30°C (86%) e 35°C (89%), e na temperatura de 20°C ocorre apenas 4% de germinação (ANDRADE et al., 2000).

Em outro estudo se observou que sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) apresentavam maior germinação a 30° (80%), e que o limite inferior de temperatura para que a germinação ocorra, está entre 15°C e 20°C e o superior, entre 35°C e 40°C (NASCIMENTO et al., 2000).

Lima et al. (2004) em seu trabalho observou que sementes de café (*Coffea arabica* L.) pertencentes à mesma família do jenipapo (Rubiaceae) condicionadas em água a 15°C e 25°C apresentaram melhor desempenho do índice de velocidade de germinação, em relação a temperatura de 35°C .

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie *Genipa americana* L. é uma frutífera de grande importância, tanto pelo consumo dos seus frutos in natura, como pelo seu potencial medicinal, cosmético e florestal. O jenipapo apresenta ampla distribuição geográfica, no entanto, pouca informação se tem sobre sua germinação e diversidade genética.

Considerando a importância socioeconômica da espécie, surge a necessidade de trabalhos científicos objetivando a elaboração de estratégias voltadas para o pré-melhoramento e manejo.

O presente trabalho tem como enfoque principal o estudo da diversidade genética e das características germinativas de indivíduos procedentes do Estado de Sergipe. A realização desse estudo apresenta extrema relevância uma vez que, a partir dos resultados obtidos, será possível avaliar a existência de diversidade genética da espécie e o comportamento da germinação das sementes sob diferentes condições de estresse. Com isso, será possível através da diversidade indicar indivíduos que poderão ser utilizados em futuros trabalhos de melhoramento, e também determinar a melhor condição que favoreça a germinação das sementes desta espécie visando uma maior produção de jenipapo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 617–631, 2008.

ANDREO-SOUZA, Y.; FERREIRA, A.L.; SILVA, F.F.S.; RIBEIRO-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 manso. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32(2), p. 83-92, 2010.

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

AZERÊDO, G. A. de. **Qualidade fisiológica de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth.** Tese. (Doutorado em Agronomia).2009. 134 f. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, 2009.

BARBOSA, D de A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *genipa americana* L. (rubiaceae).** 2008. 138 f.Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ, 2008.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; CESARO, A. dos S.; LIMA, G. P. P. L.; GONÇALVES, A. N. Germinação de sementes de pinho-cuiabano sob deficiência hídrica com diferentes agentes osmóticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 157-163, jun. 2008.

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

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

BORÉN, A & CAIXETA, E. T. **Introdução aos Marcadores Moleculares**. Introdução aos Marcadores Moleculares. 1. ed. Viçosa: Editora JARD, v. 1. 384 p. 2009.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, p.9-78, 2006.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Colombo**. p. 640, 1994.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p. 2000.

CHIFFOLEAU, Y. & DESCLAUX, D. Participatory plant breeding: the best way to breed for sustainable agriculture. **International Journal of Agricultural Sustainability**, v. 4(2): p. 119-130, 2006.

COIMBRA, J. L.; ALMEIDA, N. S. ; GARRIDO, M. S. ; SOARES, A. C. F. ; SOUSA, C. S. ; SOUZA, D. O. Nematóides fitoparasitos associados a fruteiras nativas e exóticas na região do recôncavo da Bahia, Brasil. **Revista Magistra**, v. 18, p. 48-51, 2006.

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

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C.S.; REGAZZI, A. J. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v. 2, p. 585, 2003.

DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS, R. O. S.; SANTOS, L. S. L. In: SANTOS- SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. EMBRAPA, p. 275-291, 2009.

DAWSON, J. C. & MURPHY, K.M. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. **Euphytica**, v.160, p. 143-254, 2008.

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

DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. do. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep. 278p. 1998.

DUAN, D.; LIU, X.; KHAN, M. A.; GUL, B. Effects of salt and water stress on the germination of *Chenopodium glaucum* L. seed. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36, p. 753-800, 2004.

ESPAENET. Disponível em:

http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=2&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20110927&CC=MX&NR=2011003234A&KC=A.

Acesso em 14 de junho de 2014.

- EPISTEIN, L. Cultivo e aproveitamento do jenipapo. **Revista Bahia Agrícola**, v.4,n.3, p.23-24, 2001.
- FERNANDES, P.D.; GHEYI, H. R.; ANDRADE, E. P.; MEDEIROS, S. S. Biossalinidade e produção agrícola. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, 472p, 2010.
- FERREIRA, A.G. AND F. BORGHETTI. Germination: From Basic to Applied. Artmed, Porto Alegre. 2004.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p 220. 1998.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.307-319, 2004.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GALINDO, E. A.; BARROZO, L. M. Estresse salino e temperaturas na germinação e vigor de sementes de *Chorisia glaziovii* O. Kuntze. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 2 p. 279 - 288, 2011.
- JOSHI, K.; CHAVAN, P.; WARUDE, W.; PATWARDHAN, B. Molecular markers in herbal drug technology. **Current Science**, v. 87, p. 159-165, 2004.
- KAYA, M. D.; OKÇU, G.; ATAK, M.; ÇIKILI, Y.; OZER, K. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europa Journal of Agronomy*, v. 24, p. 291–295, 2006.
- KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics J.**, v. 2, p. 141-162, 2009.
- LIAO, L.; GUO, Q.; WANG, Z.; LIU, L.; ZHU, Z. Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, 209–217, 2012.
- LIMA, S. M. P.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M das G. G. C. Effects of the times and temperatures of conditioning on the physiological quality of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) under ideal conditions and under thermal stress. **Ciência agrotecnica**, v. 28, n. 3, p. 505-514, 2004.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. 3. ed. São Paulo: Plantarum, p. 302, 2000.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. **Plantarum**. 302p, 1992.
- MACHADO, A. T.; FERNANDES, M. Participatory maize breeding for low nitrogen tolerance. **Euphytica**, Wageningen, v.122, p. 567-573, 2001.

- MACHADO, A.T. Manejo dos recursos vegetais em comunidades agrícolas: enfoque sobre segurança alimentar e agrobiodiversidade. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p.717-744, 2007.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 495p, 2005.
- MARTINS, L; COUTINHO, E. L; PANZANI, C. R; XAVIER, N. J. D. **Fruteiras nativas do Brasil e exóticas**, Campinas, CATI, 1 p. p.112, 2002.
- MEDEIROS, J.F. Salinização em áreas irrigadas: manejo e controle. In: FOLEGATTI, M.V. et al. **Fertirrigação: flores, frutas e hortaliças**. Guaíba: Agropecuária, v. 2, cap.2, p.201-240, 2001.
- MELO. A. C. G; DURIGAN, G; KAWABATA, M. **Crescimento e sobrevivência de espécies arbóreas plantadas em áreas de cerrado, Assis-SP**. In: Boas, O. V. & Durigan, G. Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no oeste paulista: Resultados da cooperação Brasil/Japão. ed. São Paulo: Páginas & Letras. p. 316-324, 2004.
- MENESES, C. H. S. G. **Qualidade fisiológica de sementes de algodão submetidas a estresse hídrico induzido por polietilenoglicol-6000**. 2007. 97 f. (Dissertação, Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2007.
- MORRIS, M. L.; BELLON, M. R. Participatory plant breeding research: opportunities and challenges for the international crop improvement system. **Euphytica**, Wageningen, v. 136, p. 21-35, 2004.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N. **A Medicinal Plants of Brazil** . Algonac: Robert A. DeFillipps, p. 294-300, 2000.
- MOURA, M. R. de; LIMA, R. P.; FARIAS. S. G. G. de; ALVES, A. R.; SILVA, R. B. e. Efeito do estresse hídrico e do cloreto de sódio na germinação de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. **Revista Verde**. Mossoró – RN, v.6, n.2, p.230 – 235, 2011.
- NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa, (Circular Técnica, 33). p. 12, 2004.
- NASCIMENTO, W. M. O. do; CARVALHO, J. E. U. de; CARVALHO, N. M. de. Germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.), submetidas a diferentes temperaturas e substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 22, n. 3, p. 471-473. 2000.
- NETTO, A. de O. A.; GOMES, C. C. S.; LINS, C. C.; BARROS, A. C.; COMPECHE, L. F. de S. M.; BLANCO, F. F. Características químicas e salino-sodicidade dos solos do Perímetro Irrigado Califórnia, SE, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.6, 2007.
- NETO, G. G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista eletrônica Mestrado Educação Ambiental**. ISSN 1517-1256, v.17, p. 71-89, 2006.
- OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Apostila do Instituto Agrônomo de Campinas, p. 23, 2007.

OLIVEIRA, L. O. de; VENTURINI, B. A.; ROSSI, A. A. B.; HASTEREITER, S. S. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 86-93, 2010.

PEREIRA, W. A.; PEREIRA, S. M. A.; DIAS, D. C. F. dos S. Influence of seed size and water restriction on germination of soybean seeds and on early development of seedlings. **Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.316-322, 2013.

QUEIROZ, S. É. E. **Mecanismo e controle da germinação de sementes de *Genipa americana* L.** Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). 2009. 64 f. Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras-MG, 2009.

QUEIROZ, S. E. E.; SILVA, E. A. A. da; 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*, Copenhagen, v. 144, p. 263-267, 2012.

RABBANI, A. R. dos S.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; CARVALHO, S. V. Á.; NUNES, F. B. S.; BRITO, A. S. Efeito do estresse salino sobre atributos da germinação de sementes de girassol. **Scientia Plena**, v. 9, 2013.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

ROCHA, M. A. C. **Morfogênese *in vitro* em jenipapeiro (*Genipa americana* L.).** (Dissertação, Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA. 66 f. 2006.

RODRIGUES, F. da P. **Estimativa da variabilidade genética de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e *D-loop* de quatro localidades da Amazônia: diferença entre calha e tributários.** (Dissertação, Mestrado em Genética, conservação e biologia evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Manaus - AM, 96p. 2009.

RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V. P.; RUAS, E. A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 319-327, 2003.

SAEED, S.; BAROZI, M. Y. K. A review on genetic diversity of wild plants by using different genetic markers. **Pure Applied. Biology**, v. 1, p. 68-71, 2012.

SALOMÃO, A. N; PADILHA, L. S. **Avaliação preliminar da germinabilidade e da micoflora associada às sementes de *Genipa americana* em diferentes estágios de maturação.** Circular técnica. Brasília, DF, 9p. 2006.

SANTOS, P. de A. **Manejo do jenipapeiro (*genipa americana* l.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, Cruz das Almas-Bahia.** 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Recurso Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas-BA, 2012.

SANDRI, S. Jenipapo. **Globo Rural**, v.13, n.147, p. 60-63, 1998.

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

SANTOS, A. R. F. **Variabilidade genética de jenipapo (*Genipa americana* L.) em área de mata ciliar do Baixo São Francisco visando a produção de sementes.** 2007. 30 F. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal – Núcleo de Engenharia Florestal). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2007.

SANTOS, A. R. F. dos; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; BRITO, A. de S. Water pre-hydration as priming for *moringa oleifera* lam. seeds under salt stress. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, p. 201 - 207, 2011.

SANTOS, R. O. S. **Caracterização de jenipapeiros (*Genipa americana* L.) em Cruzdas Almas – BA.** 2001. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -Universidade Federal da Bahia, 2001.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética especial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, v. 53, p. 15-30, 1998.

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, Â. NDJONDJOP, M. N. An overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p. 2540-2568, 2006.

SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F. ; LEDO, A. S. ; VITÓRIA, M. F. Banco de Germoplasma de Jenipapo. *Revista Magistra*, v. 25, p. 74-75, 2013.

SILVA, C. A.; VIEIRA, M. F.; OKANO-CARVALHO, R. M. de; OLIVEIRA, L. O. de. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 62, 2014.

SILVA, E. A. A. da; TOOROP, P. E.; AELST, A. C.va; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, v. 220, p. 251-261, 2004.

SILVA, L. C. R; CORREA, R. S. Sobrevivência e crescimento de seis espécies arbóreas submetidas a quatro tratamentos em área minerada no cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 731-740, 2008.

SINGH, D.R.; SRIVASTAVA, A. B.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, R. C. Genetic diversity among three *Morinda* species using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 285-293, 2011.

SOBHANIAN, H.; AGHAEI, K. & KOMATSU, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerant crops? **Journal of proteomics**. v. 74(8), p. 1323-1337, 2011.

SOUZA, A. das G. C. de; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L. da.; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. do C.; CRUZ, L. A. **Fruteiras da Amazônia.** Embrapa- CPAA,. (Biblioteca Botânica Brasileira, 1). p. 204. 1996.

- SOUZA, C. N. **Caracterização física, físico-químicas e químicas de três tipos de jenipapos** (*Genipa americana* L.). 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.
- SOUZA, V. C.; BRUNO, R. L. A.; ANDRADE, L. A. Vigor de sementes armazenadas de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (VAHL.) NICH. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.6, p.833-841, 2005.
- SOUZA, G. A. de; CARVALHO M. R. de O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-849, 2008.
- STEFANELLO, R.; GARCIA, D.C.; MENEZES, N.L.; WRASSE, C.F. Influência da luz, temperatura e estresse hídrico na germinação e no vigor de sementes de anis. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.1, p.45-50, 2006.
- SUDRÉ CP; RODRIGUES R; RIVA EM; KARASAWA M; AMARAL JÚNIOR AT. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 22-27, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. O controle do florescimento. **Fisiologia vegetal**. Ed. Artmed, p. 581-609, 2004.
- TERZOPOULOS, P. J.; KOLANO, B.; BEBELI, P. J.; KALTSIKES, P. J.; METZIDAKIS, I. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. **Scientia Horticulturae**, v.105, n. 1, p. 45-51, 2005.
- TOMBOLATO, A. F. C; VEIGA, R. F. A; BARBOSA, W; COSTA, A A; JÚNIOR, R. B e Pires, E G. Domesticação e pré-melhoramento de plantas: I. Ornamentais. **O Agrônomo**, Campinas, 56(1), p. 1-3, 2004.
- TORRES, G. A. M.; GIMENES, M. A.; ROSA JUNIOR, V. E.; QUECINI, V. Identifying water stress-response mechanisms in citrus by silico transcriptome analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 888-905, 2007.
- VALERI, S. V.; PUERTA, R.; CRUZ, M. C. P. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, [S.l.], v. 64, p. 69-77, 2003.
- VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523-539, 2006.
- WANG, W.; KIM, Y.; LEE, H.; KIM, K.; DENG, X. & KWAK, S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 570-577, 2009.
- WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzimol**, v. 395, p. 134-144, 2005.

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, p.123-135. 2000.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 173-183, 1994.

5. ARTIGO 1: Diversidade genética de *Genipa americana* L. utilizando marcador ISSR

Periódico a ser submetido: Scientia Forestalis

RESUMO

Genipa americana L. é uma espécie originária da América do Sul, distribuída no Brasil do Amazonas até São Paulo, que apresenta um alto valor econômico, devido à madeira e seus frutos. Devido a sua importância socioeconômica estudos de diversidade genética desta espécie se tornam cada vez mais necessários visando identificação de genótipos divergentes que possam compor coleções de trabalho em programas de melhoramento. O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética de indivíduos de jenipapo do Estado de Sergipe e selecionar os mais divergentes para um programa de pré-melhoramento. Foi extraído o DNA de 76 indivíduos de jenipapo pertencentes ao Estado de Sergipe seguindo protocolo CTAB 2% com adaptação. Foram utilizados 14 *primers* de ISSR, e os dados de amplificação avaliados para construção de matrizes binárias que foram utilizadas para estimativa dos parâmetros: similaridade de Jaccardi, porcentagem de polimorfismos, número ótimo de fragmentos amplificados, estrutura genética e valor de coancestria pela estrutura genética espacial. Dos 14 *primers* utilizados sete foram selecionados pelo polimorfismo obtido. A diversidade genética dos indivíduos de jenipapo está distribuída de forma aleatória, independente da região de sua região de origem. E os indivíduos menos divergentes foram os localizados no município de Nossa Senhora do Socorro, sendo estes não indicados para o estudo de pré-melhoramento.

Palavras-chave: DNA genômico, *primer*, variabilidade genética.

ABSTRACT

Título: Genetic diversity of *Genipa americana* L. using ISSR marker

Genipa americana L. is a species from South America, distributed in Brazil's Amazon to São Paulo, which has a high economic value due to its wood and fruits. Because of its socioeconomic importance, studies of genetic diversity of this species become ever more needed in order to identify divergent genotypes that may compose collections of work in breeding programs. This study aimed to estimate the genetic diversity of individual's genipap the State of Sergipe and select the most divergent for a program pre-breeding. DNA from 76 individual's genipap belonging to the State of Sergipe following CTAB protocol adaptation with 2% was extracted. Similarity Jaccardi, percentage of polymorphism, great number of amplified fragments, genetic structure and value of the coancestry spatial genetic structure. 14 ISSR *primers*, and amplification data evaluated for construction of binary matrices that were used to estimate parameters were used. Seven of the 14 *primers* were selected for polymorphism obtained. The genetic diversity of individual's genipap is distributed randomly, regardless of the region of their region of origin. And the less divergent individuals were located in the municipality of Nossa Senhora do Socorro, which are not suitable for the study of pre-breeding.

Key-words: Genomic DNA, *primer*, genetic variability.

5.1. Introdução

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie de origem pré-colombiana com procedência no norte da América do Sul, sendo também encontrada na América Central, nas Antilhas e no México (SOUZA et al., 1996). Pertence à família Rubiaceae, sendo considerada uma espécie de importância econômica. Na maioria das vezes, as árvores apresentam tamanho médio em torno de 8 a 20 m, com diâmetro de 30 a 80 cm. Geralmente apresenta tronco em linha reta, com casca grossa, lisa. A copa é densa e os ramos mais baixos estão geralmente na horizontal quando comparado ao solo (LORENZI, 1992; JOKER et al., 2003).

A espécie consiste em uma boa opção para os pequenos agricultores, tanto pela madeira que pode ser utilizada na construção civil como pelos frutos de valor comercial. O fruto se destaca por possuir sabor agradável, ser pouco perecível, rico em sais minerais, vitaminas, utilizado na fabricação de refrescos, licores, doces e sorvetes, todos com grande aceitação, principalmente no mercado nordestino (PRUDENTE, 2002). Seus frutos são explorados no Estado de Sergipe para comercialização, principalmente para o consumo *in natura* e são encontrados facilmente em feiras livres e mercados (SANTOS, et al., 2007). Também é utilizada na arborização urbana e na medicina popular (COSTA et al., 2005). Na produção de cosméticos, tinturas, carvão e para fins madeireiros, ornamentais e alimentícios (SALOMÃO & PADILHA, 2006).

Considerando a importância socioeconômica da espécie, o seu potencial para atender ao mercado de frutas e madeira e a carência de informações sobre a diversidade genética da espécie, surge a necessidade de trabalhos científicos que gerem conhecimentos que viabilizem programas de conservação, de manejo e de melhoramento genético.

Essa carência de informações associada à exploração extrativista torna a espécie bastante vulnerável a diversos fatores, como o risco de perdas de genótipos com características superiores, para aproveitamento econômico e também acarreta em uma possível redução de sua diversidade genética (SOUZA, 2007).

Uma alternativa promissora para o conhecimento das características das espécies é a execução de atividades voltadas ao pré-melhoramento, que possibilita ao pesquisador

conhecer e caracterizar o material vegetal, possibilitando a seleção de espécies com potencial para subsidiar um programa de melhoramento genético.

A forma mais utilizada para caracterizar a distribuição da diversidade genética em populações naturais é através do uso de marcadores moleculares. A técnica dos marcadores moleculares oferece a possibilidade ao melhorista de acessar o genótipo da planta ao invés de simplesmente o fenótipo, como normalmente ocorre. Em razão de o fenótipo ser a expressão do genótipo, sob condições ambientais específicas, este pode mudar com o ambiente. No entanto, o genótipo, ou a constituição do DNA de um indivíduo permanece constante durante todo o seu ciclo de vida (OLIVEIRA et al., 2007).

Dentre os vários marcadores moleculares o uso de regiões ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat- Inter-Sequências Simples Repetidas) do DNA nuclear tem sido extensiva no estudo da diversidade e estrutura genética de muitas espécies porque são mais reprodutíveis, estáveis, simples e fáceis de trabalhar em comparação com outros marcadores como microssatélites e AFLP, por exemplo (GEORGE et al., 2009; FANG et al., 2012).

O ISSR utiliza uma sequência simples repetida como *primer* para amplificar um fragmento de DNA delimitado por dois microssatélites invertidos, o que gera um alto nível de polimorfismo (SILVA et al., 2011) sem o inconveniente da necessidade do conhecimento prévio das sequências que flanqueiam os microssatélites já que, por se tratar de um marcador multiloco, não requer o conhecimento do DNA a ser avaliado (BRANDÃO, 2008; SILVA et al., 2011).

O marcador molecular o ISSR é relativamente recente, assim, ainda existem poucos trabalhos publicados para caracterizar a diversidade genética dessa espécie. Como exemplo têm-se o trabalho de Santos (2012) que utilizou este marcador para estimar a diversidade genética dos 35 acessos de jenipapo procedentes de Cruz das Almas na Bahia. Porém, já foram feitos estudos de diversidade genética desta espécie utilizando outro tipo de marcador molecular como o RAPD (RABBANI et al. 2012; HANSEN, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética de indivíduos de jenipapo do Estado de Sergipe e selecionar os mais divergentes para um programa de pré-melhoramento.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material Vegetal

Para análise da diversidade genética foram coletadas amostras de folhas jovens de 76 indivíduos de jenipapo (*Genipa americana* L.) coletadas em seis regiões de Estado de Sergipe (Alto Sertão Sergipano, Baixo São Francisco Sergipano, Médio Sertão Sergipano, Leste Sergipano, Agreste Central Sergipano e Grande Aracaju) (Figura 5.1).

acrescentados 1.000 μL de álcool etílico 70% e os tubos centrifugados a 14.000 rpm por três minutos, e esta etapa repetida por três vezes. Após a terceira lavagem com álcool 70%, os precipitados foram secos ao ar e ressuspensos em 300 μL de TE.

5.2.3. Amplificação do DNA

As reações de amplificação foram preparadas para volume final de 15 μL [1,5 μL de tampão 10 X; 0,6 μL de dNTP; 1,5 μL de MgCl_2 (2,5 mM); 1,8 μL de primers ISSR (2,0 mM); 0,2 μL de Taq DNA polimerase; 2,0 μL de DNA genômico (1:100) e 7,4 μL de água ultra-pura].

Foram testados 14 *primers* (Tabela 7.2) e sete selecionados devido ao polimorfismo, sendo a seleção realizada por meio de avaliações visuais dos padrões de bandas quanto à intensidade e reprodutibilidade.

As amplificações foram realizadas em termociclador Uniscience Biometra Tpersonal. O programa de amplificação constou de etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 5.1. *Primers* ISSR utilizados para estimativa da diversidade genética dos indivíduos de *Genipa americana* L. UFS, São Cristóvão, 2014.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
AW3 (GT) 6-RG	GTGT TGT GTG TGT RG
MANNY (CAC) 4-RC	CAC CAC CAC CAC RC
MAO (CTC) 4-RC	CTC CTC CTC CTC RC
UBC 807 (AG) 8-T	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808 (AG) 8-C	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 810 (GA) 8-T	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811 (GA) 8-C	GAG GAG GAG GAG GAG AC
UBC 813 (CT) 8-T	CTC CTC CTC CTC CTC TT
UBC 825 (AC) 8-T	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 834 (AG) 8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA GY T
BECKY (CA) 7-YC	CAC ACA CAC ACA CAY C
CHRIS (CA) 7-YG	CAC ACA CAC ACA CAY G
DAT (GA) 7-RG	GAG AGA GAG AGA GAR G
JOHN (AG) 7-YG	AGA GAG AGA GAG AGY C

Sendo: R = Purina (A ou G) e Y = Pirimidina (C ou T)

5.2.4. Eletroforese

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1,0X e corado com 4 μL *GelRed nucleic acid stain* (diluído 1:1000 H_2O) em eletroforese horizontal a 100 V por por 1 hora e trinta minutos.

Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz UV em transiluminador digital (Benchtop).

5.2.5. Análises estatísticas

Os perfis eletroforéticos dos fragmentos amplificados foram empregados para construção de matriz binária, sendo a presença de fragmentos representada por 1 e ausência representada por 0. As similaridades foram estimadas por meio do coeficiente de Jaccard, segundo a expressão:

Sendo:

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	a (1,1)	b (1,0)
	0	c (0,1)	d (0,0)

Onde:

a = presença da bandas em ambos os genótipos;

b = presença da banda no primeiro genótipo e ausência no segundo;

c = presença no segundo e ausência no primeiro;

d = a ausência em ambos os genótipos.

Com a matriz binária a porcentagem de polimorfismo obtido com cada *primer* utilizado foi calculada por meio da expressão:

$$P = \frac{nbp}{nbt} \times 100$$

Onde: P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

Número ótimo de fragmentos amplificados: foram obtidas as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada por meio do programa computacional GENES versão 6.5.

A matriz de similaridade de Jaccard foi usada para a construção de dendrograma empregando o programa NTSYS pc 2.0 (ROHLF, 2001).

Foi realizada análise de estrutura genética visando obter inferências acerca do número de grupos genéticos (K) fundamentada no modelo de agrupamento bayesiano com o auxílio do programa STRUCTURE v. 2.3 (PRITCHARD, 2014).

A estrutura genética espacial foi estimada a partir do valor de coancestria pelo coeficiente de *kinship*, entre os pares de indivíduos para as classes de distância empregando o programa SPAGEDI versão 2 (HARDY & VEKEMANS, 2002).

5.3. Resultados e discussão

Dos 14 *primers* de ISSR testados, para estimar a diversidade genética de indivíduos de *Genipa americana* L., apenas 7 foram selecionados, por meio da análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados (TABELA 5.2).

Tabela 5.2. *Primers* ISSR selecionados para estimativa da diversidade genética dos indivíduos de *Genipa americana* L. UFS, São Cristóvão, 2014.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
AW3 (GT) 6-RG	GTGT TGT GTG TGT RG
MANNY (CAC) 4-RC	CAC CAC CAC CAC RC
MAO (CTC) 4-RC	CTC CTC CTC CTC RC
UBC 810 (GA) 8-T	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 834 (AG) 8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA GY T
BECKY (CA) 7-YC	CAC ACA CAC ACA CAY C
JOHN (AG) 7-YG	AGA GAG AGA GAG AGY C

Como observado na Tabela 5.3, os 7 *primers* utilizados geraram um total de 107 locos ISSR, sendo todos polimórficos, que corresponde a uma porcentagem de polimorfismo de 100%. O número de locos observados por *primer* variou entre 8 e 26. Um loco foi considerado polimórfico quando houve pelo menos um alelo diferente dos demais.

Tabela 5.3. *Primers* de ISSR selecionadas para estimar a diversidade genética dos indivíduos de *Genipa americana* L. com de locos gerados e a porcentagem de polimorfismo. UFS, São Cristóvão, 2014.

PRIMERS	Nº total de locos	Nº de locos polimórficos	% Polimorfismo
AW3 (GT) 6-RG	26	26	100
MANNY (CAC) 4-RC	8	8	100
MAO (CTC) 4-RC	12	12	100
BECKY (CA) 7-YC	18	18	100
JOHN (AG) 7-YG	15	15	100
UBC 810 (GA) 8-T	17	17	100
UBC 834 (AG) 8-YT	11	11	100
Total	107	107	100

Em trabalho realizado para estimar a diversidade de espécies do gênero *Galium* da mesma família do jenipapo (Rubiaceae), foram utilizados 4 *primers* ISSR, e obteve-se um total de 92 locos polimórficos e número de bandas variou de 5 a 50 por *primer* (KHALIK et al, 2014). Para a espécie medicinal *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae), foram testados 100 *primers* ISSR, dos quais, apenas cinco foram selecionados, produzindo um total de 89 locos, com média de 17,8 locos por *primer* (OLIVEIRA et al., 2010).

Para o presente trabalho o número ótimo para obter precisão desejada nas análises de diversidade genética com a espécie em estudo foi a partir de 75 fragmentos polimórficos, quando o estresse (E) assumiu valor de 0,04 e a correlação (r) de 0,99 (Figura 5.2).

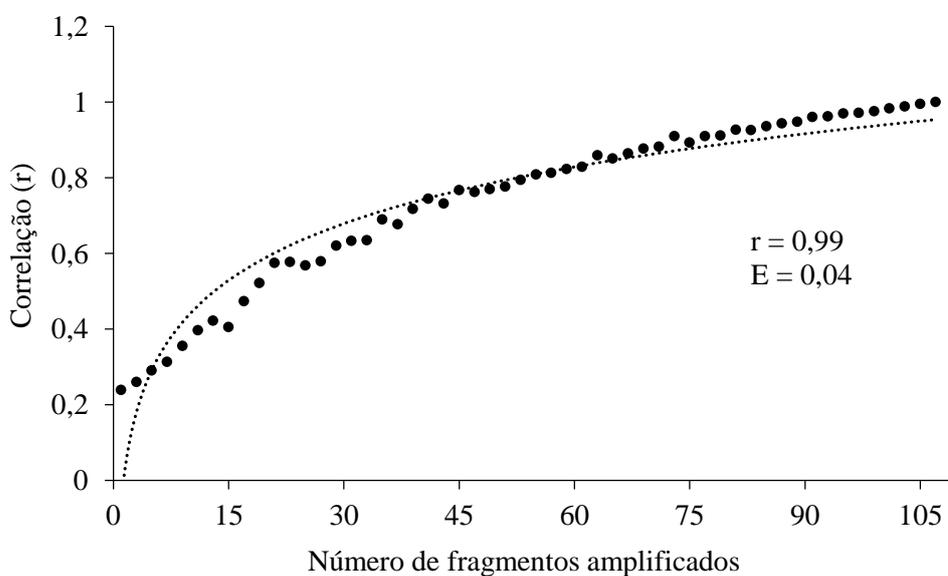


Figura 5.2: Coeficiente de correlação (r) e número de fragmentos obtidos para os 76 indivíduos de *Genipa americana* L. empregando marcadores ISSR. UFS, São Cristóvão, 2014.

A partir do número ótimo de fragmentos obtidos (90), o valor do coeficiente de correlação se aproximou do valor máximo (1,0), que demonstra a consistência dos dados para o número de *primers* utilizados e o número de fragmentos obtidos, mostrando-se suficientes para as análises de diversidade genética.

Esses valores estão de acordo com o valor informado por Colombo et al. (2000), onde o intervalo entre 50 e 100 fragmentos é suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de populações de espécies vegetais.

A análise dos resultados e a indicação do número mínimo de *primers* de ISSR utilizados neste trabalho, contribuiu para a otimização do uso dos recursos e do tempo, traduzidos em menor número de *primers* representativos da amostragem do genoma para caracterização da diversidade genética.

Em trabalho realizado com outras espécies utilizando poucos marcadores de ISSR, também foi possível realizar o estudo de diversidade genética. Como o mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), utilizando 11 *primers* de ISSR obteve 117 fragmentos polimórficos, quando o estresse assumiu valor de 0,048 e a correlação (r) de 0,991 (GONÇALVES et al., 2014). E a *Myrcia splendens* (SM.) utilizando 10 *primers* do marcador ISSR, observou que o número ótimo de fragmentos para sua espécie foi de 55 e os valores de estresse foi inferior a 0,05 e a correlação de 0,957 (BRANDÃO, 2008).

As relações genéticas entre os indivíduos foram estimadas utilizando dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard através dos 107 locos obtidos com os marcadores de ISSR (Figura 5.3).

Observou-se que existe diversidade genética entre os 76 indivíduos estudados, e que houve a formação de três grandes grupos, sendo que estes não foram divididos de acordo com a região de origem de cada indivíduo. Sendo os menos divergentes os indivíduos 3 e 5 de Nossa Senhora do Socorro. O coeficiente máximo de similaridade de Jaccard obtido foi de 0,67 e o mínimo de 0,11.

Sendo então, a maior ou menor similaridade entre os indivíduos aqui estudados independe do local onde foram coletados, o que sugere que a variação ambiental não influi de maneira significativa na diversidade.

Em outro trabalho utilizando este marcador genético e 35 acessos de jenipapo provenientes de Cruz das Almas na Bahia, foi possível obter a formação de três grupos, com coeficientes de dissimilaridade variando de 14% até uma distância máxima de 100%, e constatou-se com esses resultados que existe grande diversidade entre os indivíduos estudados procedentes daquela localidade (SANTOS, 2012).

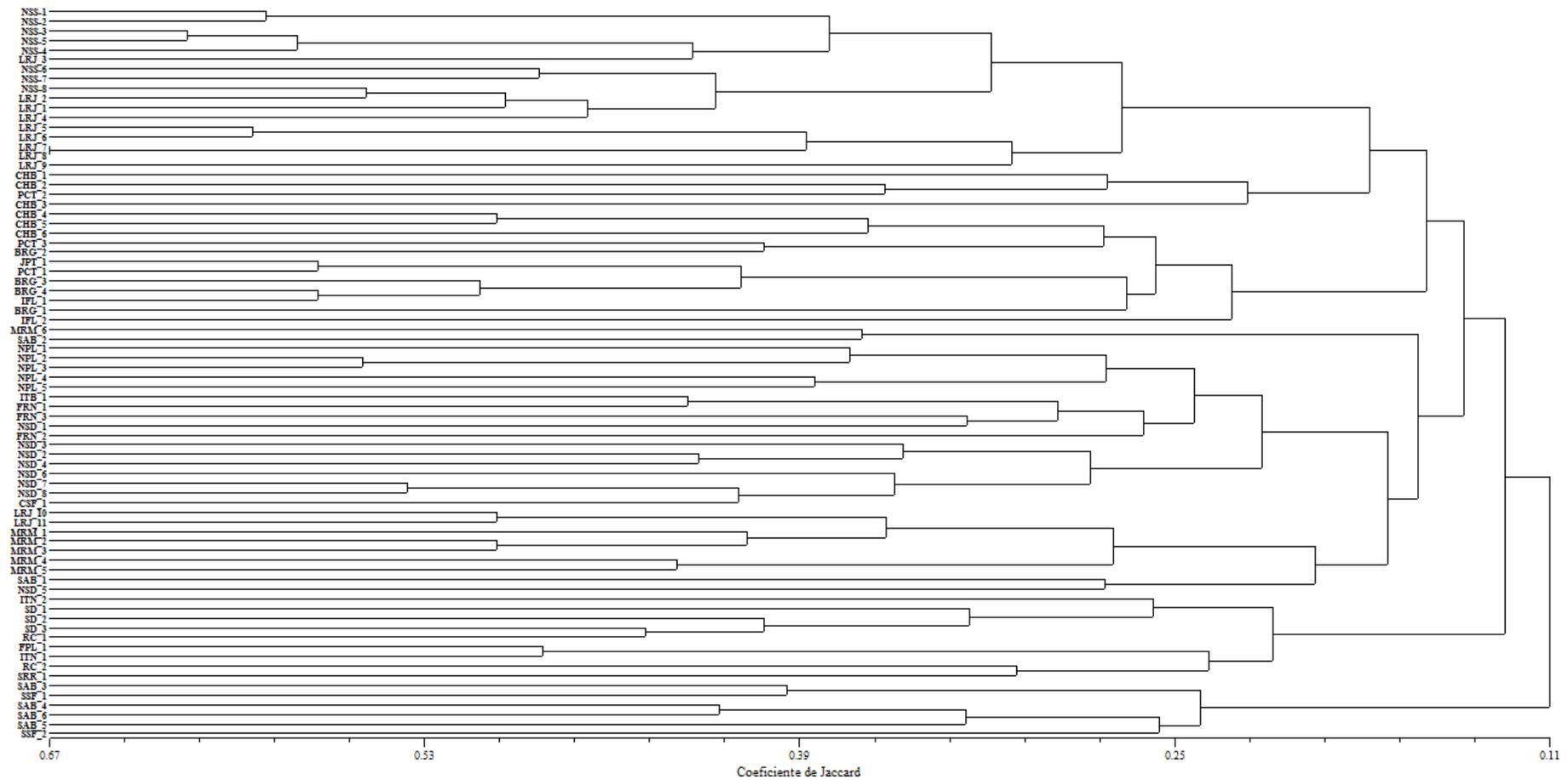


Figura 5.3. Dendrograma baseado no índice de similaridade de Jaccard para os 76 indivíduos de *Genipa americana* L., utilizando marcadores ISSR. UFS, São Cristóvão, 2014.

Os resultados obtidos com o programa STRUCTURE por meio da análise Bayesiana possibilitaram observar a estrutura genética entre os indivíduos, formando novos grupos com base no genótipo (Figura 5.4).

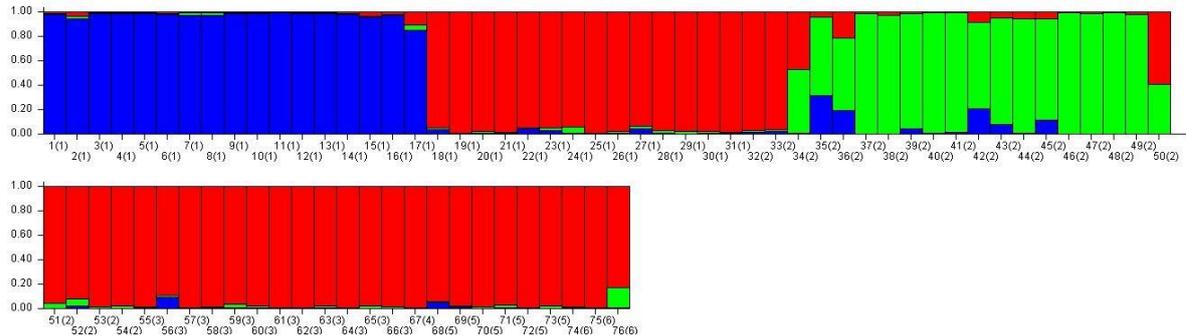


Figura 5.4. Estrutura genética de indivíduos de *Genipa americana* L. a partir da análise Bayesiana (STRUCTURE) dos 76 indivíduos coletados do Estado de Sergipe. Cada (n) indica a região de origem dos indivíduos. UFS, São Cristóvão, 2014.

A atribuição de cores dada a cada indivíduo significa a proporção de ancestralidade (q_i - *proportion of ancestry in each cluster*) do genótipo, bem como a classificação dos indivíduos. Indivíduos com cores até 1.00 representam 100% de probabilidade de pertencer a uma determinado grupo, sendo considerado que um indivíduo pertence a um determinado grupo a uma probabilidade maior que 80% ($q_i > 80\%$). Indivíduos com q_i inferior a 80% ($q_i < 80\%$) podem proceder de outros grupos.

A partir dessa análise foi observada a formação de três grupos genéticos distintos ($K=3$). A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo, cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com outros grupos.

Notou-se que o maior grupo com base no genótipo foi o que apresentou a cor vermelha, e esse agrupamento foi formado de indivíduos de diversas regiões algumas próximas e outras distantes em relação a distância (Figura 5.5).

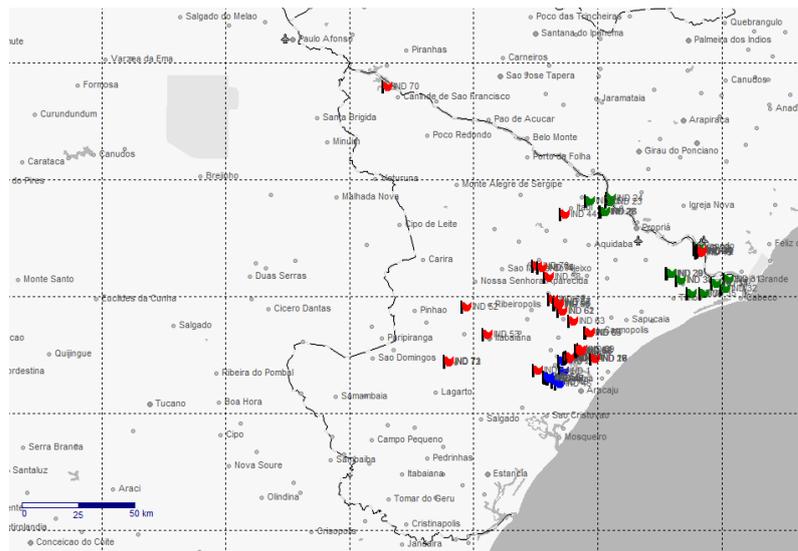


Figura 5.5. Mapa do Estado de Sergipe, indicando a distribuição genética de acordo com a análise do STRUCTURE dos indivíduos de jenipapo. UFS, São Cristóvão, 2014.

Foi possível observar também que os fatores climáticos de cada região não apresentam influência na formação de grupos, pois, houve o agrupamento de indivíduos provenientes de locais com fatores ambientais diferentes. E isso também mostrou que a base genética está distribuída aleatoriamente.

Como a maioria dos indivíduos de jenipapo ficou agrupada no grupo correspondente a cor vermelha e existe pouco compartilhamento do genoma deste grupo com os outros, o melhor a ser feito para aumentar essa base genética é coletar indivíduos provenientes dos outros grupos e inserir neste grupo para aumentar a estrutura genética, para que não haja o cruzamento de indivíduos aparentados, pois, isso pode comprometer a evolução natural da espécie e reduzir a capacidade de adaptação da mesma frente a diferentes fatores ambientais.

É importante também melhorar essa base genética, pois, o jenipapo é base de subsistência de pequenos agricultores que a exploram de forma extrativista para a sua comercialização.

O correlograma obtido por meio do programa SPAGeDI ilustra a distribuição espacial dos indivíduos de *Genipa americana* L. (Figura 5.6). Em cada indivíduo, foi estimada dez classes de distância espacial.

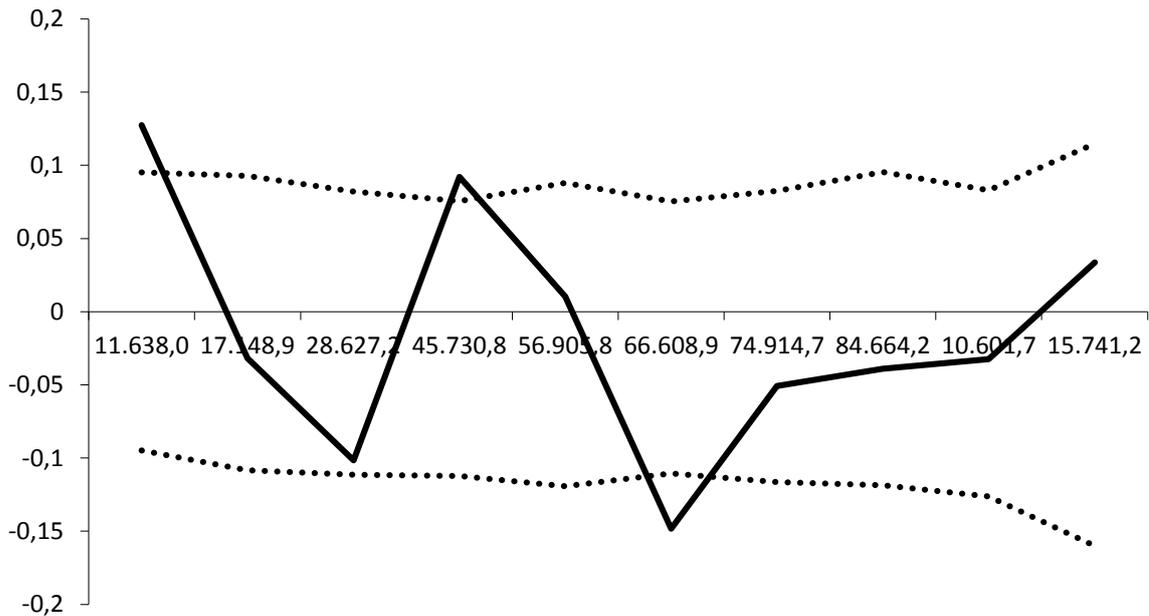


Figura 5.6. Correlograma do coeficiente de coancestria, por classes de distâncias, para indivíduos de *Genipa americana* L. do Estado de Sergipe. UFS, São Cristóvão, 2014.

De acordo com a análise, pode-se observar que o padrão de distribuição espacial entre os indivíduos estudados está distribuída aleatoriamente. Esse fato, de estruturação genética espacial dentro das populações, pode estar relacionado com a dispersão limitada de pólen e sementes (SMOUSE & PEAKALL, 1999).

As classes de distâncias representadas no correlograma, além de informação importante para o manejo, é uma indicação da distância mínima entre indivíduos amostrados para programas de melhoramento genético da espécie e para a coleta de sementes para programas de recuperação de áreas degradadas, de forma a obter maior variabilidade genética (KELLY et al., 2004; CLOUTIER et al., 2007).

O estudo da distribuição espacial entre os indivíduos de jenipapo poderá contribuir para a seleção de material genético que pode ser utilizado nos programas de melhoramento (ou pré-melhoramento) e de conservação genético da espécie.

5.4. Conclusão

A diversidade genética dos indivíduos de *Genipa americana* L. está distribuída independente da região de origem, e os indivíduos apresentaram-se bastante divergentes, menos os indivíduos de Nossa Senhora do Socorro. Por isso, sugeri-se a coleta de indivíduos

procedentes das outras regiões que apresentaram-se mais divergentes para serem utilizados em trabalhos de pré-melhoramento e também programas de conservação.

5.5. Referências Bibliográficas

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais.** 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Departamento de Engenharia Florestal. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

CLOUTIER, D. et al. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in na Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v.16, n.4, p.797-809, 2007.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

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

FANG, H.; GUO, Q.; SHEN, H.; LI, Y. Genetic diversity evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. by medicinal compounds and molecular biology tools. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 26–34, 2012.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 11, p. 2022–2030, 2009.

GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, abr-jun, 2014.

HANSEN, D. de S. **Marcadores agronômicos e moleculares na caracterização de jenipapeiros do Recôncavo Baiano.** 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal da Bahia-UFBA, Cruz das Almas-BA, 2006.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.

JOKER, D.; SALOMÃO, A. N. e VASQUEZ, W. *Genipa americana* L. **Seed Leaflet**. n.67, 2003.

KELLY, B. A.; HARDY, O. J.; BOUVET, J. Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. **Molecular Ecology**, v.13, p.1231-1240, 2004.

KHALIK, K. A.; EL-TWAB, M. A.; GALAL, R. Genetic diversity and relationships among egyptian *Galium* (Rubiaceae) and related species using ISSR and RAPD markers. **Section Botany, Biologia**, v. 69, p. 300-310, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 302.

OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Apostila do Instituto Agrônomo de Campinas, p. 23, 2007.

OLIVEIRA, L. O. O. DE; VENTURINI, B. A.; ROSSI, A. A. B.; HASTENREITER, S. S. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 86-93, 2010.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. Structure software version 2.3. Disponível em: <http://pritch.bsb.echicago.edu>. 2014.

PRUDENTE, R. M. **Jenipapo** (*Genipa americana* L.). In: VIEIRA NETO, R. D. Fruteiras potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas. Aracaju: Embrapa-CPATC/Emdagro. P. 88- 114, 2002.

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, Viçosa-MG**, v.36, n.3, p.401-409, 2012.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York. Version 2.1. 2001.

SALOMÃO, A. N.; PADILHA, L. S. **Avaliação preliminar da germinabilidade e da micoflora associada às sementes de *Genipa americana* em diferentes estágios de maturação**. Circular técnica. Brasília, DF, 9p. 2006.

SANTOS, A. R. F. **Variabilidade genética de jenipapo (*Genipa americana* L.) em área de mata ciliar do Baixo São Francisco visando a produção de sementes**. 2007. 30 F. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal – Núcleo de Engenharia Florestal). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2007.

SANTOS, P. de A. **Manejo do jenipapeiro (*genipa americana* l.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, Cruz das Almas-Bahia**. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Recurso Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo Baiana, Cruz das Almas-BA, 2012.

SILVA, K. V. P. da; ALVES, A. A. da C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F. de; CARVALHO, R. de. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SMOUSE, P. E.; PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. **Heredity**, v.82, n.5, p.561-573, 1999.

SOUZA, A. das G. C. de; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L. da.; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. do C.; CRUZ, L. A. **Fruteiras da Amazônia**. Embrapa- CPAA,. (Biblioteca Botânica Brasileira, 1). p. 204. 1996.

SOUZA, C. N. **Caracterização física, físico-químicas e químicas de três tipos de jenipapos** (*Genipa americana* L.). 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

6. ARTIGO 2: Parâmetros germinativos em *Genipa americana* L. sob condições de restrição hídrica, salinidade e variação de temperatura

Periódico a ser submetido: Scientia Plena

RESUMO

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é espécie frutífera, medicinal e cosmética de grande importância no nordeste do Brasil. Apesar de toda a sua importância socioeconômica, ainda existe uma carência de trabalhos relacionados ao mecanismo e ao controle de germinação para subsidiar um programa de melhoramento visando a produção comercial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento das sementes de jenipapo quanto a tolerância à restrição hídrica, salinidade e temperatura. As sementes foram avaliadas quanto ao ganho de água durante o processo germinativo e os dados dispostos em curva de embebição. Para isto as sementes foram embebidas em papel de germinação com água destilada contendo 2,5 vezes o seu peso e mantidas em BOD à 30°C, e o ganho de água em gramas avaliado a cada 2 horas até 12 horas, e depois a cada 24 horas durante 8 dias. Para as variações de restrição hídrica, as sementes foram colocadas sobre papel de germinação embebido na proporção de 2,5 vezes o seu peso em cinco diferentes potenciais osmóticos obtidos com soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) a 0, -0,1, -0,2, -0,3 e -0,4 MPa. A mesma metodologia foi empregada para o estresse salino, com soluções de cloreto de sódio a 0, 25, 50, 100 e 200 mol m⁻³. Quanto à temperatura as sementes foram submetidas a 15, 25, 30, 35 e 40°C. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições de 25 sementes, mantidas durante os testes em incubadora (tipo BOD) a 25 °C ± 2 (exceto para o estresse térmico), todos sob luz contínua. As sementes são afetadas quando submetidas a -0,3 MPa e -0,4 MPa. Maiores valores de germinação foram encontrados em 25 mol m⁻³. A temperatura ótima para a germinação das sementes de jenipapo é 30°C.

Palavras-chave: jenipapo, polietilenoglicol, estresse térmico, estresse salino.

ABSTRACT

Título: Parameters germinal in *Genipa americana* L. under conditions of water restriction, salinity and temperature variation

The jenipapeiro (*Genipa americana* L.) is fruitful, medicinal and cosmetic species of giant importance in northeastern Brazil. Despite all its socioeconomic importance, there is still a lack of work related to the mechanism and control of germination to support a breeding program aimed at commercial production. The objective of this study was to evaluate the behavior of seeds jenipapo as tolerance to water restriction, salinity and temperature. Seeds were evaluated for water gain during the germination process and the data arranged in the imbibition curve. For this the seeds were soaked in germination paper with distilled water containing 2.5 times its weight in BOD and maintained at 30 °C and the water gain in grams evaluated every 2 hours until 12 hours, and then every 24 hours for 8 days. For variations in water restriction, the seeds were placed on germination paper soaked in the proportion of 2.5 times its weight in five different osmotic potentials obtained with polyethylene glycol (PEG 6000) at 0, -0.1, -0.2, -0.3 and -0.4 MPa. The same methodology was used for salt stress, with solutions of sodium chloride at 0, 25, 50, 100 and 200 mol m⁻³. For temperature, seeds were subjected to 15, 25, 30, 35 and 40°C. Each treatment consisted of four replicates of 25 seeds, maintained during testing in an incubator (BOD) at 25 ± 2 °C (except for heat stress), all under continuous light. The seeds are affected when subjected to -0.3 MPa and -0.4 MPa. Higher germination values were found in 25 mol m⁻³. The optimum temperature for seed germination is 30 °C jenipapo.

Key-words: genipap, polyethylene glycol, temperature stress, salinity stress.

6.1. Introdução

O jenipapo (*Genipa americana* L.), da família Rubiaceae, é uma espécie secundária tardia, com características de clímax, de crescimento moderado que ocorre em todo país¹. Pode ser usada na arborização urbana e é também uma boa opção para os pequenos agricultores, tanto pela madeira como pelos frutos de valor comercial. A casca, os frutos, a raiz, as folhas e as sementes também podem ser utilizados na medicina popular². A sua principal forma de exploração no Estado de Sergipe é extrativista, feito por pequenos agricultores, e ainda não existe relatos de produção comercial desta espécie.

Para se obter o êxito na produção comercial de qualquer cultura diversos fatores devem ser observados antes da sua implantação em campo. O Nordeste do Brasil apresenta características adversas de clima, solo e temperatura que podem prejudicar o desenvolvimento inicial das espécies. Para o estabelecimento de programas de melhoramento visando a produção econômica da espécie é necessário o conhecimento da germinação das sementes sob condições de variações de restrição de água, salinidade e temperatura, uma vez que estes parâmetros podem auxiliar na seleção de genótipos.

A germinação é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e das condições favoráveis de ambiente. Essas condições ou requerimentos básicos para germinação variam entre as espécies de plantas e é determinado pelo genótipo e pelas condições ambientais disponíveis durante a formação das sementes³.

Os fatores favoráveis à germinação são a água, o oxigênio e a temperatura que influenciam, consideravelmente, o processo de germinação sendo que a quantidade desses fatores varia de acordo com as espécies e cultivares⁴.

Uma das tecnologias tem sido a exposição das sementes para germinação sob restrição hídrica, salinidade e temperatura. Esses tratamentos agem como um condicionante e isto

permite a ocorrência das fases iniciais do processo de germinação, beneficiando ou não a maior velocidade de estabelecimento da semente no campo.

Embora tenham sido realizados alguns estudos para avaliar o desempenho da germinação das sementes de jenipapeiro, existe uma carência de trabalhos relacionados ao mecanismo e ao controle de germinação.

Estudar a germinação de sementes sob diferentes condições de estresse é importante para que se possa determinar o limite de resistência destas, frente às diferentes condições adversas ⁵, principalmente considerando as variações climáticas.

Estudos de germinação das espécies são importantes, pois, também contribuem para o desenvolvimento de tecnologias que podem ser adotadas no processo de produção de mudas ⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento das sementes de jenipapo quanto a tolerância à restrição hídrica, salinidade e temperatura.

6.2. Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sementes do Centro de Ciências Agrárias Aplicadas (CCAA) da Universidade Federal de Sergipe. Foram utilizados frutos de jenipapeiro, com procedência de Itabi-SE e Divina Pastora-SE. Os frutos foram beneficiados com o auxílio de peneira e água corrente para retirada das sementes. As sementes obtidas foram colocadas para secar a sombra por 24 horas, e selecionadas quanto ao tamanho (maiores) e integridade (sem quebras ou danos). As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 4 % por 10 minutos, e em seguida lavadas três vezes com água destilada e colocadas sobre papel toalha para secagem e posterior composição dos tratamentos.

6.2.1. Determinação da Curva de embebição

Para determinação da curva de embebição foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, estas foram distribuídas em papel de germinação embebido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram mantidas em incubadora tipo BOD à 30°C conforme sugerido por Nascimento et al. (2000), sob luz contínua. As avaliações do ganho em peso por embebição foram realizadas inicialmente a cada 2 horas nas primeiras 24 horas. As avaliações posteriores ocorreram a cada 24 horas até a protrusão radicular.

Para avaliar o ganho de água pelas sementes, foi realizada a pesagem em balança analítica de uma semente e do conjunto de 25 sementes por repetição. A média dos dados das pesagens foi estimada para uma semente e para a média de 25 sementes e usadas para elaboração da curva de embebição.

6.2.2. Condições de restrição hídrica

As sementes foram submetidas à germinação em papel germiteste embebido com 2,5 vezes o peso do papel com soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) a 0,0 (testemunha); -0,1; -0,2, 0,3 e - 0,4 MPa e as sementes dispostas em rolos de papel em incubadora do tipo BOD à 25 °C. A germinação das sementes nestas condições foi realizada a cada dois dias computando-se o início da protusão das radículas e número de plântulas normais ao longo do período de avaliação.

Para a determinação da quantidade de PEG 6000 a ser adicionada no preparo de cada solução foi utilizada a equação ⁷:

$$\Psi_{os} = - (1,8 \times 10^{-2}) C - (1,8 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2T$$

onde:

Ψ_{os} = potencial osmótico (MPa);

C : concentração (g PEG 6000 L⁻¹);

T : temperatura (°C).

6.2.3 Estresse por salinidade

As sementes foram dispostas para germinar em papel germiteste umedecido com 2,5 vezes o peso do papel com soluções de 0, 25, 50, 100 e 200 mol m⁻³ de cloreto de sódio (NaCl). A seguir as sementes foram dispostas sobre o papel e os rolos mantidos em incubadora do BOD à 25 °C por 46 dias.

A germinação das sementes nestas condições foi realizada a cada dois dias computando-se o início da protusão das radículas e número de plântulas normais ao longo do período de avaliação.

6.2.4 Estresse térmico

As sementes foram dispostas em papel germiteste embebidas com 2,5 vezes o peso do papel com água destilada e colocadas para germinar nas temperaturas de 15, 25, 30, 35 e 40°C sob luz contínua em incubadora do tipo BOD.

6.2.5 Variáveis analisadas

Em todas as condições foram utilizadas para cada tratamento 100 sementes (quatro repetições de 25 sementes), distribuídas em rolos de papel germiteste embebido na proporção de 2,5 vezes o seu peso com as concentrações descritas para cada tratamento.

Os rolos foram identificados e colocados em sacos plásticos para que não houvesse contato entre os tratamentos de diferentes concentrações. Estas foram mantidas a temperatura de 25°C ± 2, sob luz contínua (exceto para o estresse térmico), em câmara de germinação tipo BOD e avaliadas até a formação de plântulas de acordo com a Regra de Análise para Sementes.

As avaliações foram realizadas durante 46 dias para restrição hídrica e salinidade; e 43 dias para o tratamento térmico, todos avaliados em intervalos de 48 horas. As variáveis usadas para avaliação das sementes estão descritas a seguir.

6.2.5.1 Viabilidade e vigor

A viabilidade foi avaliada por meio da porcentagem de germinação (%G) ⁸, tendo como base a formação de plântulas normais.

$$\% G = \frac{N}{A} \times 100, \text{ em que:}$$

% G = porcentagem de germinação;

N = número de sementes germinadas; e

A = número total de sementes colocadas para germinar.

O vigor foi avaliado por meio do Índice de Velocidade Germinação (IVG) ⁹, Tempo Médio de Germinação (TMG) ¹⁰ e Velocidade média de germinação (VMG) ¹⁰, conforme as expressões:

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

IVG = Índice de Velocidade de Germinação;

G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas, computadas na primeira, segunda até a última contagem; e

N1, N2, Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda até a última contagem.

$$\text{TMG} = \frac{\sum ni \cdot ti}{\sum ni}, \text{ em que:}$$

TMG = tempo médio de germinação (dias);

$\sum ni$ = número de sementes germinadas num intervalo de tempo; e

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

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

V = velocidade média de germinação (sementes/ dia); e

TMG = tempo médio de germinação.

6.2.5.2 Desenvolvimento e peso seco

As plântulas normais foram medidas no seu comprimento com auxílio de uma régua graduada em centímetros, da parte aérea (cm) e do sistema radicular (cm). O peso seco foi determinado por meio da pesagem das plântulas que foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 70°C durante 48 horas.

6.2.6 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando o teste de F, e análise de regressão polinomial empregando o pacote estatístico SISVAR¹¹.

6.3. Resultados

6.3.1 Curva de embebição

Observou-se que a embebição das sementes de *Genipa americana* L. em água segue um padrão trifásico, durante o período estudado, 7 dias. A Figura 6.1 é caracterizada pelo ganho de água (g) e o tempo de embebição (horas) que a semente absorve até a germinação. Ao total foram necessárias 168 horas de embebição para a emissão radicular e uma absorção total de 0,21(1 semente) e 0,33 (25 sementes) gramas de água pela semente para que ocorresse à germinação.

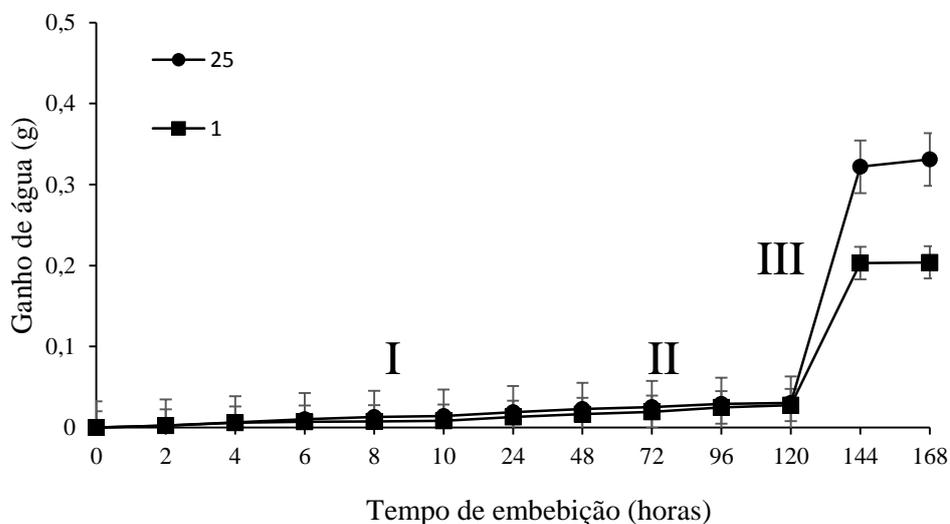


Figura 6.1. Curva de embebição das sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) em água. UFS, São Cristóvão, 2014.

De modo geral, as sementes quando passam pelo processo de embebição apresentam três fases distintas. Na primeira fase ocorre a absorção de água e o aumento de massa da semente. Na segunda fase acontece uma menor absorção de água (estagnação) e a reativação dos processos metabólicos, e a última fase ocorre quando novamente há um aumento na absorção de água e a protusão radicular ¹².

Para as sementes de jenipapo, o início da Fase I, onde ocorre a absorção de água ocorreu nas primeiras 48 horas com um ganho de água de 0,016 (uma semente) e 0,022 (25 sementes) gramas. A Fase II, intervalo de preparação da ativação metabólica, ocorreu de a partir de 48 até 120 horas com um ganho de água de 0,031 (uma semente) e 0,027 (25 sementes) gramas. A Fase III, onde inicia a germinação, ocorreu a partir de 120 horas e se observou ganho de água de 0,20 (uma semente) e 0,33 (25 sementes) gramas.

A absorção de água para as sementes de jenipapo na primeira fase foi relativamente rápida (Fase I), seguida por uma fase estável (Fase II), e depois uma retomada na absorção de água (Fase III), sendo que esta só ocorre quando a germinação é cumprida, em que o eixo embrionário alonga e rompe através de suas estruturas de cobertura.

Em estudos realizados com essa mesma espécie foi possível observar também a formação do padrão trifásico definido. A fase I ocorreu por aproximadamente até o 4º dia de embebição, a fase II foi caracterizada a partir do 5º dia e a fase III iniciando a protusão da radícula após o 8º dia das sementes de jenipapo ¹³. Sementes de (*Genipa americana* L.) apresentaram um padrão trifásico e a protusão da radícula se deu a partir do décimo oitavo dia (432 horas) ¹⁴. A protrusão da radícula ocorre de 8 a 13 dias após o início da embebição de sementes de jenipapo, e foi avaliado até 26 dias de germinação ^{15,16}.

É importante realizar estudos sobre o comportamento das sementes durante a germinação, pois, com ele é possível entender melhor a qualidade fisiológica e os mecanismos de germinação sob condições ambientais adversas. Através desse conhecimento, o produtor pode fazer um levantamento e um planejamento de quando e onde pode plantar, para ter um menor prejuízo possível na sua produção.

Portanto, conhecer as fases de absorção de água e dos estágios de embebição apresentados por diferentes espécies, é essencial em projetos de pesquisa visando melhoria da qualidade de sementes ¹⁷. E sua regulação é fundamental para o sucesso em programas de conservação e técnicas de revegetação ¹⁸.

6.3.2 Restrição hídrica

Para avaliação da germinação das sementes sob restrição hídrica verificou-se comportamento diferencial das sementes para cada um dos tratamentos, com maior incremento da germinação nos potenciais menos restritivos -0,1; -0,2 e -0,3 MPa. A germinação teve início após 10 dias de tratamento e foi avaliada até 46 dias (Figura 6.2).

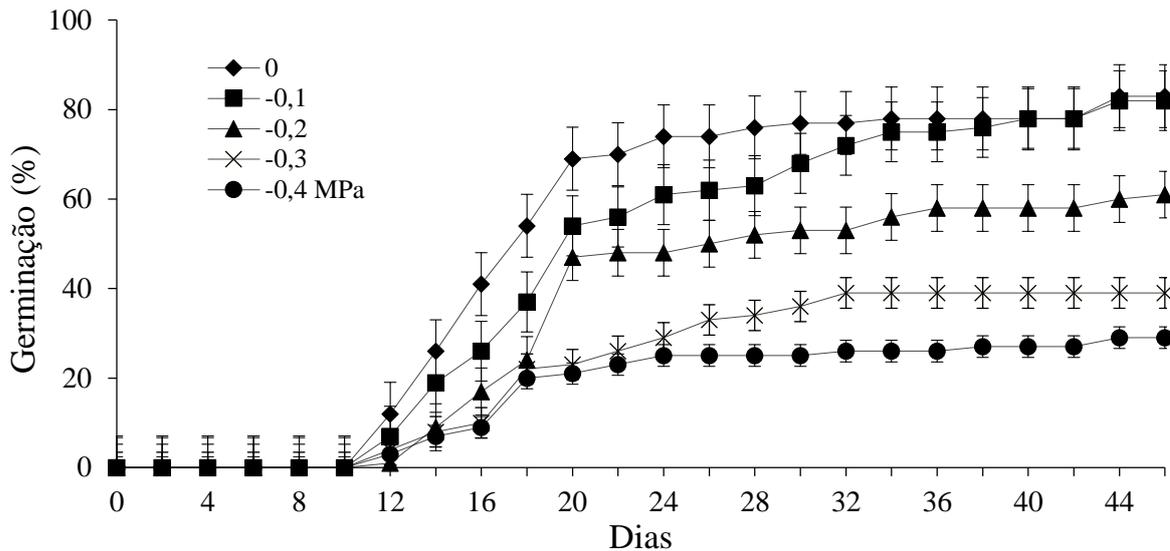


Figura 6.2. Evolução da porcentagem de germinação em dias para sementes de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.

Verificou-se maior porcentagem de germinação para a testemunha (83%) e nos tratamento de -0,1 MPa (82%), seguidos de -0,2 (61%), sendo que a partir de -0,3 MPa (39%) houve decréscimo da variável até o tratamento -0,4 MPa (29%). O mesmo comportamento foi observado para o Índice de Velocidade de Germinação (Figura 6.3).

Vieira e Krzyzanowsky¹⁹ afirmam que para variável IVG quanto maior o valor apresentado, maior é capacidade das sementes expressarem seu potencial, o que demonstra que a salinidade influenciou no vigor das sementes de girassol a partir de -0,3 MPa.

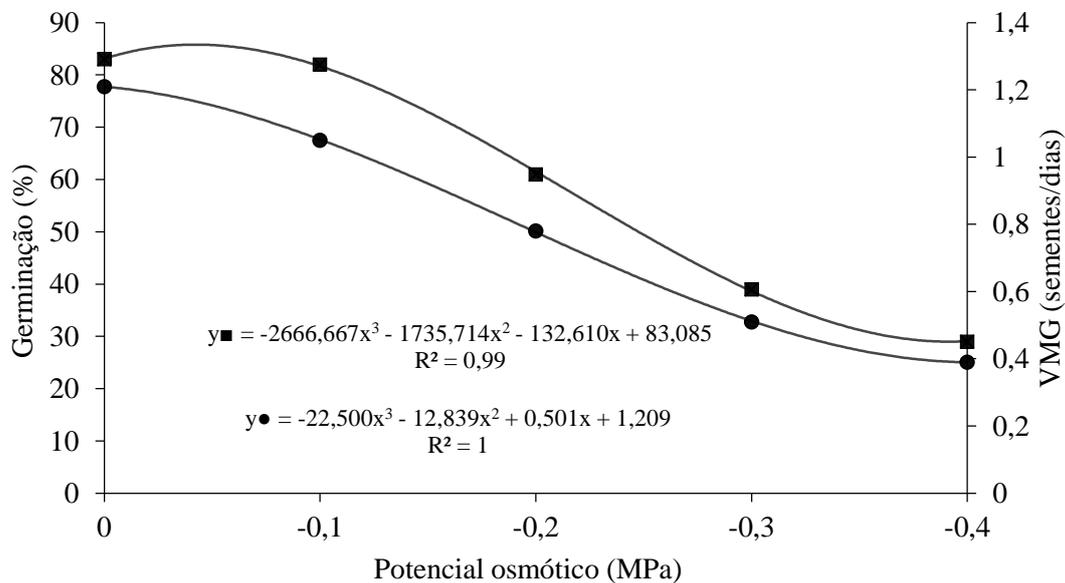


Figura 6.3. Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.

A velocidade com que as sementes germinam é importante para um estabelecimento satisfatório das plântulas no campo. O atraso na germinação pode sujeitar as sementes às condições ambientais desfavoráveis, bem como ao ataque de agentes bióticos, ocasionando prejuízos ao desempenho em porcentagem de germinação.

Quanto a variável TMG, as sementes germinaram com 18 dias (0 MPa) e 19 (-0,4 MPa), e para a variável VMG 0,05 (0 MPa) e 0,02 (-0,4 MPa) (Figura 6.4).

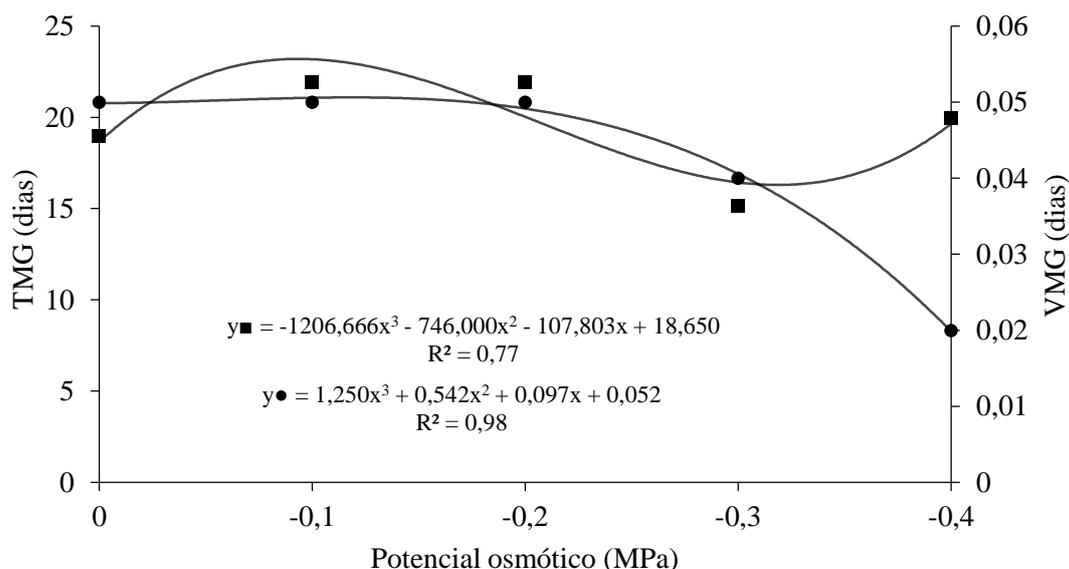


Figura 6.4. Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.

Resultados semelhantes com *Genipa americana* L. foram encontrados, onde observou que em sementes embebidas em papel com a solução osmótica de polietilenoglicol (PEG 6000), ocorre germinação de 95% para a testemunha e 51,25% para -0,1 MPa, e para os potenciais -0,3 e -0,4 MPa não houve germinação²⁰.

O resultados de vigor e viabilidade apresentados anteriormente, foram um indicativo de que o comprimento e o peso seco das plântulas também foram afetados pela restrição hídrica. Sendo os melhores valores ressaltados para os potenciais osmóticos de -0,1 e -0,2 MPa de PEG (Figura 6.4 e 6.5).

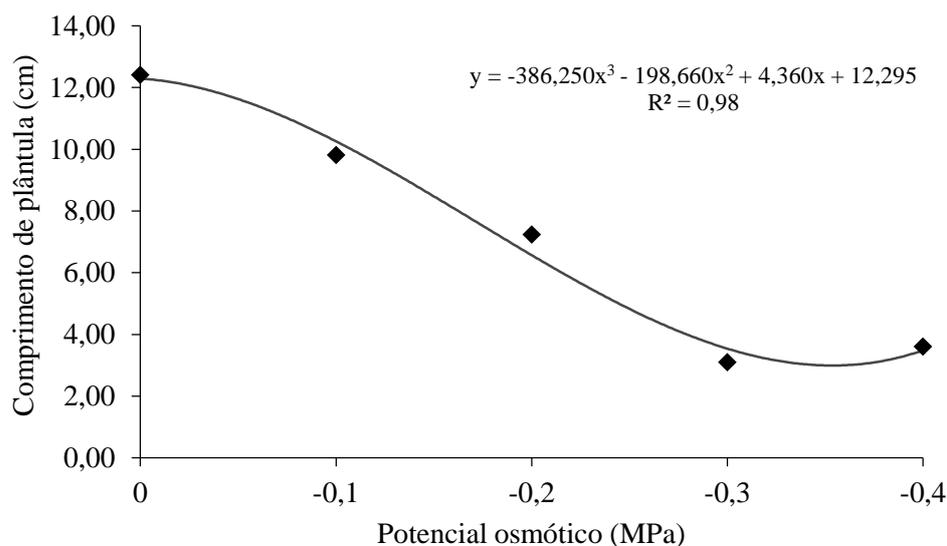


Figura 6.5. Comprimento das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.

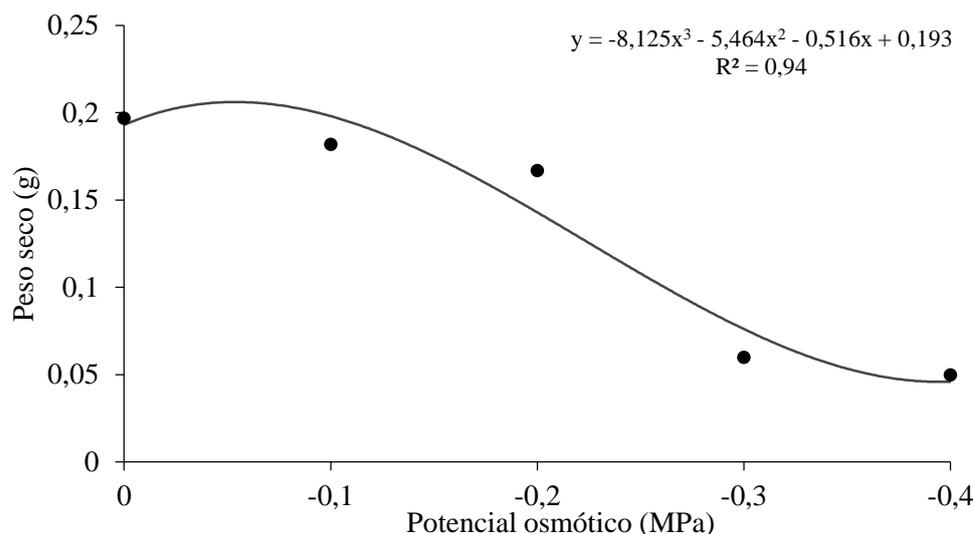


Figura 6.6. Peso seco das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por restrição hídrica com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). UFS, São Cristóvão, 2014.

Os valores baixos de germinação no tratamento sob restrição hídrica nos potenciais de -0,3 e -0,4 MPa, foi explicada por Fonseca e Perez ²¹, onde o mesmo verificou que as sementes quando colocadas em contato com determinadas concentrações de soluções aquosas contendo solutos ocorre a embebição de água normalmente, porém o processo cessa quando entra em equilíbrio com o potencial osmótico da solução externa, sem que ocorra a protrusão da raiz. Potenciais suficientemente baixos inibem a expansão da raiz primária, mesmo a semente estando metabolicamente ativa pronta para a germinação e alongamento celular, mesmo após algumas semanas de contato com a solução osmótica. Sendo a germinação um dos períodos mais críticos do ciclo de vida das plantas, esta quando submetida a estresse hídrico e baixo potencial de água acaba sendo inibida pela falta de água no meio ²².

Para as sementes de jenipapo, estes dados são importante, pois, por se tratar de uma espécie encontrada em regiões de mata ciliar, está sujeita a alagamentos e secas, ou seja, seus frutos estão expostos às variações climáticas que afetam os cursos d'água, o que pode comprometer a manutenção da espécie ao longo do tempo.

6.3.3 Estresse por salinidade

Quanto a salinidade, houve incremento na porcentagem de germinação para as menores concentrações salinas. A germinação iniciou após 10 dias de tratamento e foi avaliada até 46 dias (Figura 6.7).

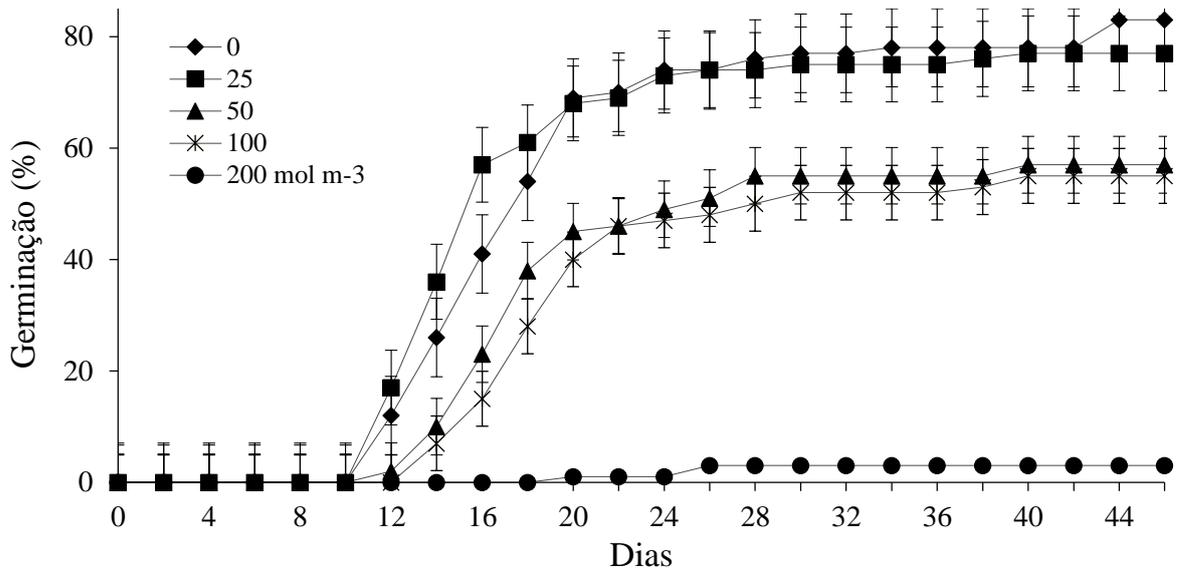


Figura 6.7. Evolução da porcentagem de germinação em dias de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.

O tratamento que teve maior porcentagem de germinação foi o tratamento com 25 mol m⁻³ (77%), sendo que a partir de 50 mol m⁻³ houve um decréscimo da variável até o tratamento com 200 mol m⁻³ (3%). Comportamento semelhante foi identificado para o Índice de Velocidade de Germinação (Figura 6.8). Diante destes resultados, pode-se deduzir que provavelmente as sementes de jenipapo apresentam maiores habilidades para germinar em ambientes onde a concentração salina seja menor ou igual a 25 mol m⁻³, sendo que que concentrações iguais ou superiores a 50 mol m⁻³ de cloreto de sódio, no meio germinativo, provoca decréscimo na porcentagem de germinação e da variável IVG.

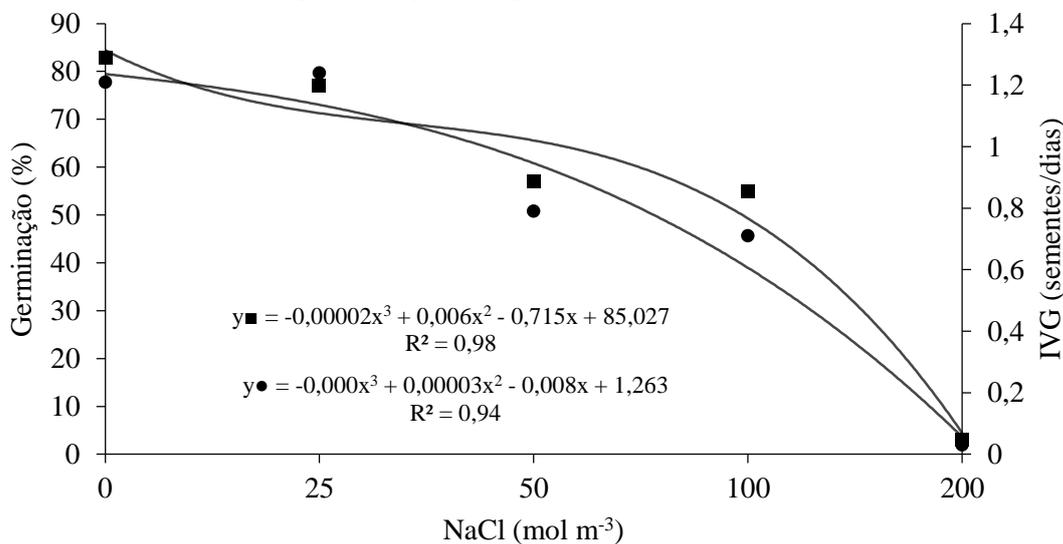


Figura 6.8. Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.

O retardamento na germinação ocasionado pela salinidade no solo, pode expor as sementes a condições ambientais desfavoráveis, como ao ataque de agentes bióticos (pragas), acarretando prejuízos ao desempenho das mesmas.

A espécie arbórea, moringa (*Moringa oleifera* Lam.) submetidas ao estresse salino, observou que essa espécie apresenta sensibilidade na germinação e no IVG aos níveis de sal iguais ou superiores a 100 mol m^{-3} e se desenvolvem bem com 25 e 50 mol m^{-3} .²³

Para a variável TMG, notou-se que a concentração salina de 25 m mol^{-3} germinou 16 dias. E para o VMG na concentração salina de 25 m mol^{-3} obteve-se 0,06.

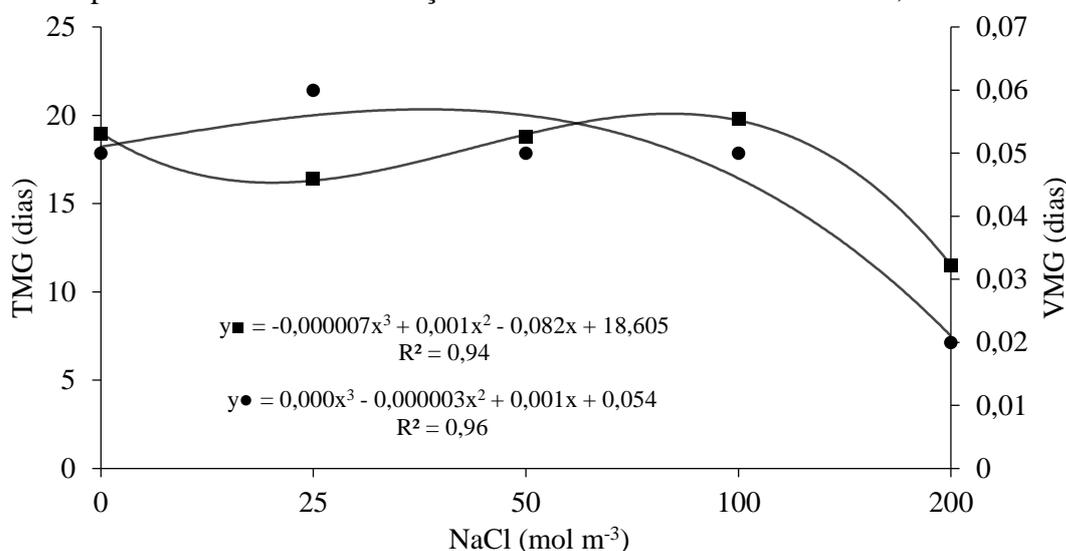


Figura 6.9. Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.

O excesso de sais solúveis provoca uma redução do potencial hídrico, induzindo menor capacidade de absorção de água pelas sementes. Esta redução do potencial hídrico e os efeitos tóxicos dos sais interferem inicialmente no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando no vigor, afetando a velocidade e conseqüentemente o tempo de germinação destas sementes quando presentes em níveis não tóxicos de salinidade²⁴.

O comprimento e o peso das plântulas também foram afetados com as concentrações salinas a partir de 50 m mol^{-3} (Figura 6.10 e 6.11).

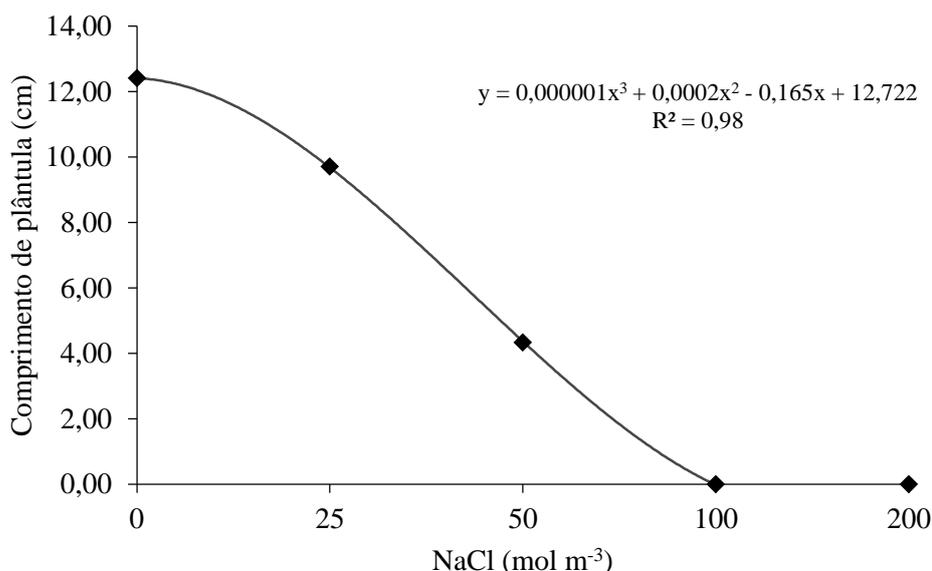


Figura 6.10. Comprimento das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.

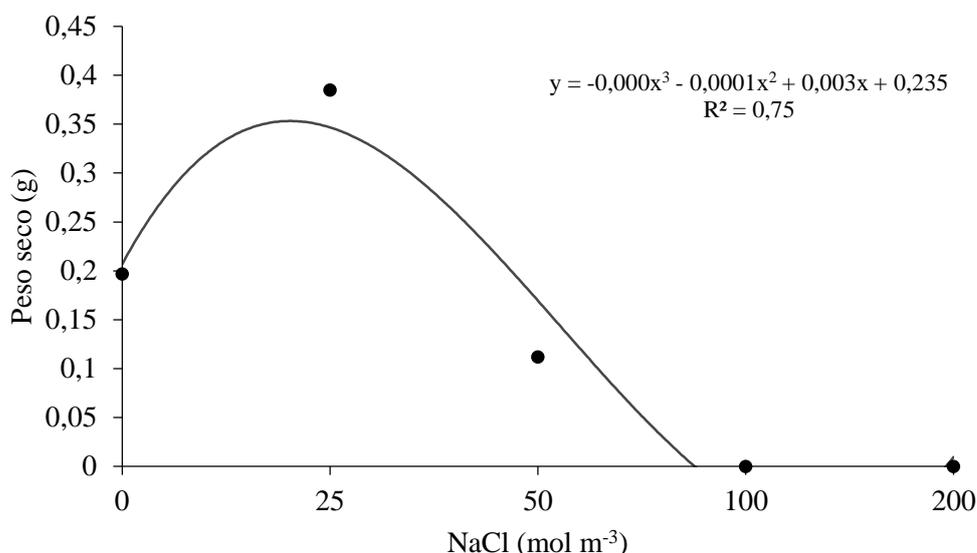


Figura 6.11. Peso seco das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas ao estresse por salinidade de cloreto de sódio (NaCl). UFS, São Cristóvão, 2014.

Isso pode ser explicado porque com a elevação da concentração salina na solução do solo ocorre um aumento da pressão osmótica e, logo a planta não absorve a água do solo, ocasionando distúrbios fisiológicos e morfológicos que dificultam a sobrevivência da planta sob estresse ²⁵. E o estresse salino nas fases iniciais da germinação tem como principal causador de injúria o desbalanço iônico e a toxicidade causada pelo excesso de sódio (Na⁺), que afetam a germinação. Afetam a atividade enzimática, resultando, principalmente, na produção inadequada de energia por distúrbios na cadeia respiratória ²⁶.

Perante os resultados obtidos no estudo, as informações adquiridas são relevantes para a região nordeste, uma vez que em solos que apresentam teores maiores ou iguais a 100 mol m⁻³ devido a irrigação mal conduzida, principalmente nas áreas de sertão, ocorrendo assim um prejuízo da germinação e dos processos germinativos em sementes de jenipapo em campo, já que está só se desenvolve melhor em concentrações salinas de 25 mol m⁻³. E isso mostra que para o plantio desta espécie é necessário um estudo sobre as características do solo a ser utilizado, para que não haja prejuízos após a sua implantação.

6.3.4 Estresse térmico

Para a germinação das sementes de jenipapo submetidas a variação de temperatura, esta teve início após oito dias para as temperaturas de 25, 30 e 35°C e não houve germinação nas temperaturas de 15 e 40°C, sendo estas restritivas para a espécie (Figura 6.12).

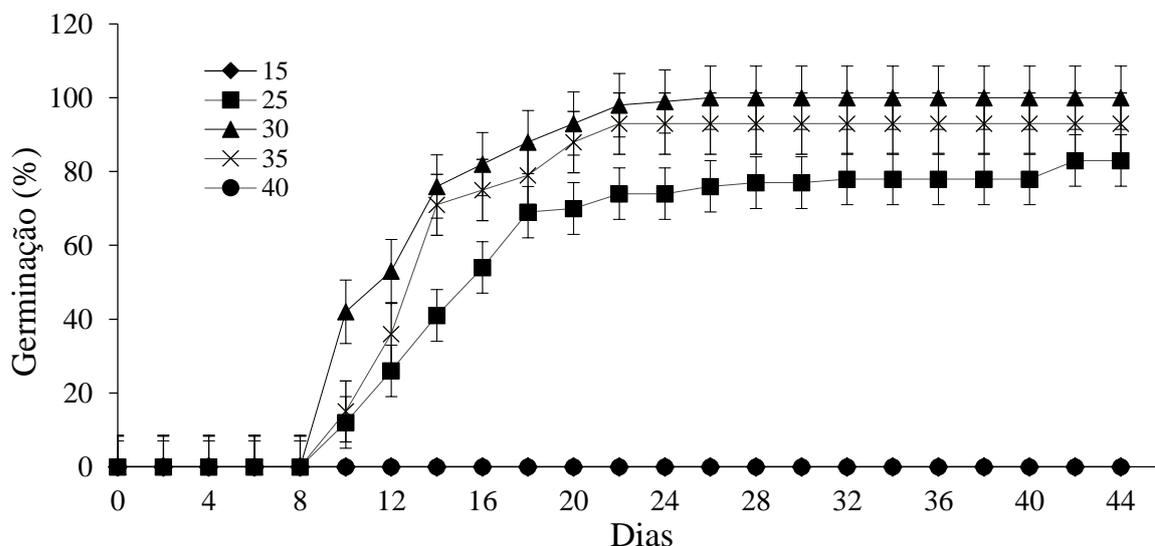


Figura 6.12. Evolução da porcentagem de germinação em dias, em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.

A maior porcentagem de germinação foi encontrada na temperatura de 30°C (100%), e para as temperaturas de 15°C e 40°C não houve germinação. O mesmo foi observado para o Índice de Velocidade de germinação (Figura 6.13).

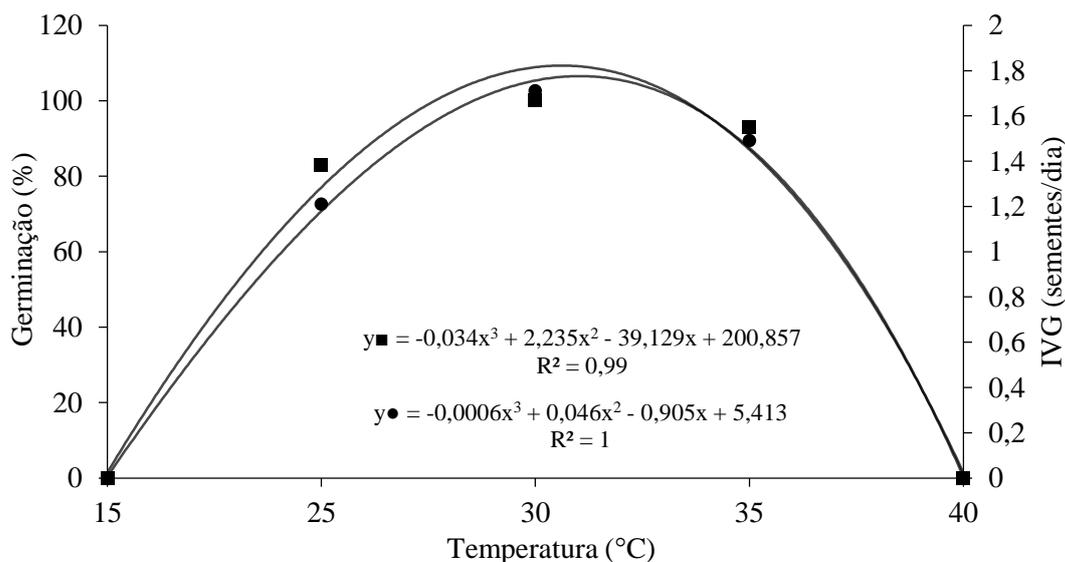


Figura 6.13. Porcentagem (■) e Índice de Velocidade de germinação (●) de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados em sementes de jenipapo provenientes de árvores existentes no Arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), onde eles testaram temperaturas constantes de 20, 25, 30, 35°C e alternadas de 20-30°C e diferentes substratos (vermiculita, solo e papel). Observaram que as temperaturas constantes de 25, 30 35°C são as recomendadas para germinação das sementes dessa espécie em todos os substratos ²⁷.

E também para sementes de jenipapo provenientes do Município de Caruçá no Pará, testou-se diferentes substratos (areia, papel filtro e papel germitest) e temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C, e observou que em todos os substratos na temperatura de 30°C houve

maior germinação, e que o limite inferior de temperatura para que a germinação ocorra, está entre 15°C e 20°C e o superior, entre 35°C e 40°C ²⁸.

Para a variável TMG os valores encontrados foram de 18,96 (25°C), 15,38 (30°C) e 16,17 (35°C); e para a VMG de 0,05 (25°C), 0,06 (30°C) e 0,06 (35°C) (Figura 6.14).

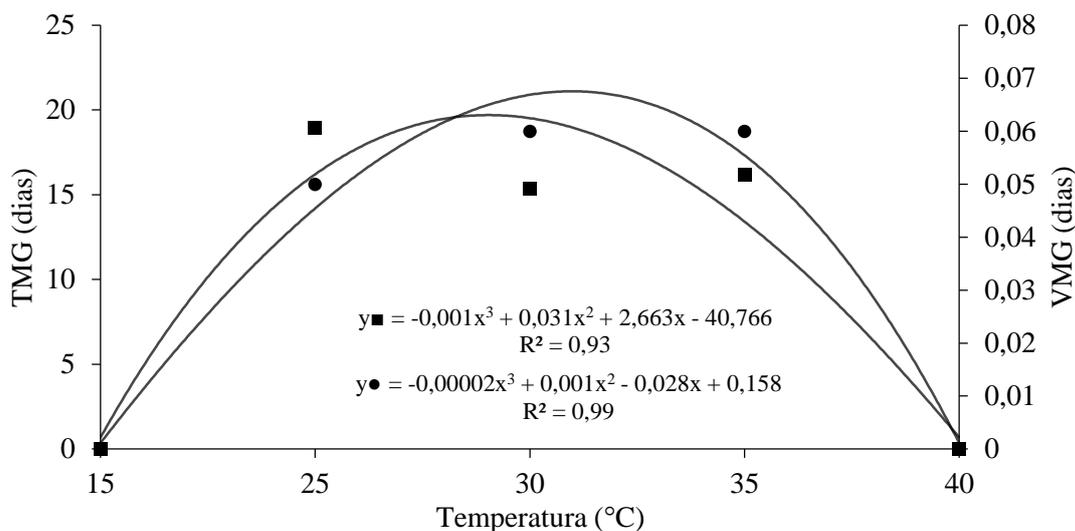


Figura 6.14. Tempo médio (■) e Velocidade média (●) de germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.

A temperatura provoca efeitos variáveis entre as sementes de espécies diferentes, onde a temperatura ideal de germinação média é dependente da genética, dependendo da morfologia de sementes e fisiologia. Esse fator também atua diretamente na velocidade de absorção de água e as relações bioquímicas que ocorrem durante a germinação ²⁹.

Para a temperatura de 25°C observou-se o melhor comprimento de plântula, seguido das temperaturas de 30°C e 35°C (Figura 6.15).

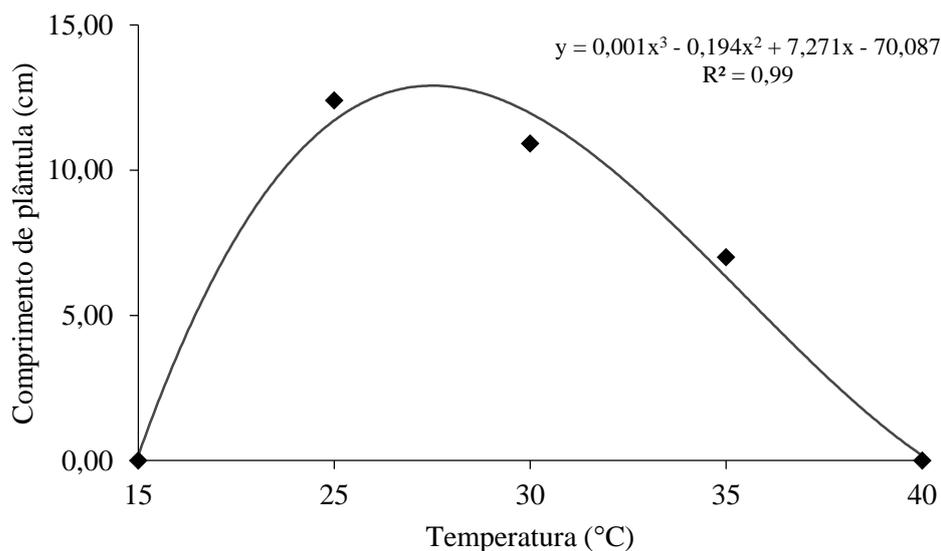


Figura 6.15. Comprimento das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.

Já para a variável peso seco, o maior valor (g) foi encontrado na temperatura de 30°C (Figura 6.16).

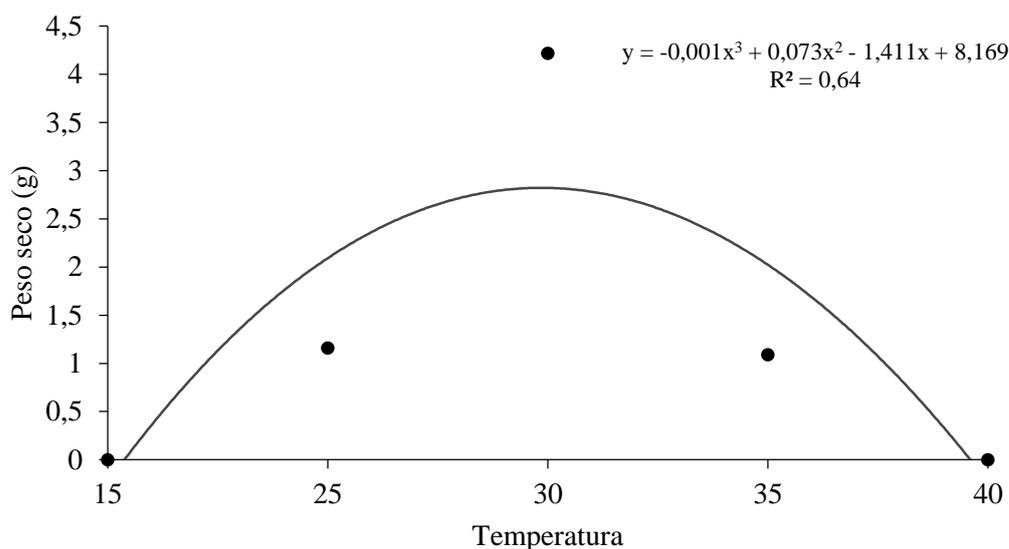


Figura 6.16. Peso seco das plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas. UFS, São Cristóvão, 2014.

Esses resultados podem ser explicados porque a temperatura, afeta o processo germinativo de três maneiras distintas: sobre o total de germinação, sobre a velocidade de germinação e sobre a uniformidade de germinação. A maioria das sementes estão inicialmente dormentes em frutos. Sementes secas continuamente perdem a dormência a uma taxa dependente de temperatura. Sementes hidratadas respondem diferencialmente, e altas temperaturas reforçam ou podem induzir a dormência. Baixas temperaturas podem também induzir dormência em algumas circunstâncias, mas em muitas espécies ela é estimulada (resposta à estratificação), especialmente dentro de uma faixa de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma vez que as sementes perdem a dormência, assim existe uma relação linear positiva entre a temperatura base (abaixo da qual a taxa é zero) e a temperatura ótima (acima da qual é máxima); e uma reação linear negativa entre uma temperatura ótima e da temperatura limite (acima da qual a taxa é novamente zero). Portanto, a germinação só ocorrerá dentro de certos limites de temperatura: acima ou abaixo dos limites superior ou inferior, a germinação não ocorrerá. Assim, a temperatura ótima é aquela que possibilita a combinação mais eficiente entre a porcentagem e a velocidade de germinação³⁰. E no caso do presente trabalho a temperatura ótima que combinou o melhor desempenho no processo germinativo foi a de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois, a que obteve maior interação entre as variáveis analisadas.

É importante ressaltar também que a temperatura ótima de germinação para espécies arbóreas vem sendo muito estudada, pois, as espécies apresentam grande variação quanto a temperatura ideal. Outro fator de grande relevância é que na Instrução Normativa Nº 44, de 23 de dezembro de 2010, ainda não existem condições de germinação sugeridas para *Genipa americana* L., sendo assim, esses resultados tornam-se importantes, pois, estes podem auxiliar na definição das condições a serem usadas em testes oficiais pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

6.4. Conclusões

As sementes de jenipapeiro necessitam de 168 horas de embebição para a germinação.

O vigor e a viabilidade das sementes de jenipapeiro são afetados quando submetidos aos potenciais de $-0,3\text{ MPa}$ e $-0,4\text{ MPa}$.

Quanto a salinidade as sementes apresentaram maiores potenciais de germinação em 25 mol^{-3} .

A temperatura ótima para a germinação das sementes de jenipapo é de 30°C e as subótimas de 25°C e 35°C.

6.6. Referências Bibliográficas

1. CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Colombo. p. 640, 1994
2. COSTA, M. C. da; ALBUQUERQUE, M. C. de F.; ALBRECHT, J. M. F.; COELHO, M. de F. B. Substratos para produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, p. 19-24, 2005.
3. BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Prenum Press, p. 445, 1994.
4. MENESES, C. H. S. G. **Qualidade fisiológica de sementes de algodão submetidas a estresse hídrico induzido por polietilenoglicol-6000**. 2007. 97 f. (Dissertação, Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2007.
5. AZERÊDO, G. A. de. **Qualidade fisiológica de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth.** Tese. (Doutorado em Agronomia).2009. 134 f. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, 2009.
6. SILVA, E. A. A. da; MELO, D. L.B.; DAVIDE, A. C.; BODE, N.; ABREU, G. B.; FARIA, J. M. R.; HILHORST, H. W. M. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, London, p. 1-8, 2007.
7. MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycoI 6000. **Plant Physiology**, v.51, n.6, p.914-6, 1973.
8. LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, n.2, p.263-284, 1976.
9. MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.
10. LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, p. 174, 1983.
11. FERREIRA, D. F. **Versão 5.3**. 2010.
12. BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Prenum Press, p. 445, 1994.
13. MAGISTRALI, P. R. **Efeito de taxas de secagem na tolerância à dessecação e o armazenamento de sementes de *Genipa americana* L.** Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). 2013. 92 f. Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras-MG, 2013.
14. QUEIROZ, S. É. E. **Mecanismo e controle da germinação de sementes de *Genipa americana* L.** Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). 2009. 64 f. Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras-MG, 2009.

15. SOUZA, A. F.; ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; LOUREIRO, M. B. Ecophysiology and morphology off seed germination of the neotropicalowland tree *Genipa americana* (Rubiaceae). **Journal of Tropical Ecology**. Cambridge, v. 15, p. 667-680, 1999.
16. ANDRADE, A. C. S. de; SOUZA, A. F. de; RAMOS, T. S. P.; CURZ, A. P. M. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.3, p.609-615, 2000.
17. PINHO, S. Z. de; CARVALHO, L. R. de C.; DELACHIEVE, M. E. A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 17-20, 2004.
18. SILVA, E. A. A. da; DAVIDE, A. C.; FARIA, M. R.; MELO, D. L. B. de; ABREU, G. B. de. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, p. 1-9, 2004.
19. VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. **Brasília: ABRATES**. Cap. 4, p. 1-26, 1999.
20. SANTOS, A. R. F. dos S.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.2, p.213-220. 2011.
21. FONSECA, S. C. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenantha pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.1-6, 2003.
22. WANG J G, CHEN G C, ZHANG C L. The effects of water stress on soluble protein content, the activity of SOD, POD and CAT of two ecotypes of reeds (*Phragmites communis*). **Acta Botany Borea1-Occident**, v. 22, p. 561-565, 2002.
23. SANTOS, A. R. F. dos S.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; BRITO, A. D. S. Water pre-hydration as priming for *Moringa oleifera* Lam. seeds under salt stress. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 14, p. 201 – 207. 2011.
24. CAVALCANTE, A. M. B.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**. 30: 281-289, 1995).
25. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2006.
26. LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 531p. 2000.
27. ANDRADE, A. C. S. de; SOUZA, A. F. de; RAMOS, T. S. P.; CURZ, A. P. M. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.3, p.609-615, 2000.
28. NASCIMENTO, W. M. O. do; CARVALHO, J. E. U. de; CARVALHO, N. M. de. Germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.), submetidas a diferentes

temperaturas e substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 22, n. 3, p. 471-473. 2000.

29. FERREIRA, A.G. AND F. BORGHETTI. Germination: From Basic to Applied. Artmed, Porto Alegre. 2004.

30. MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

ANEXOS

TABELA 1A. Municípios de prospecção dos indivíduos de jenipapo (*Genipa americana* L.) no Estado de Sergipe. UFS, São Cristóvão, 2014.

Município	Latitude	Longitude
Nossa Senhora do Socorro	10°49'23.5"S	37°08'17.5"W
Nossa Senhora do Socorro	10°52'41.9"S	37°09'11.0"W
Nossa Senhora do Socorro	10°52'10.9"S	37°10'06.8"W
Nossa Senhora do Socorro	10°51'22.1"S	37°11'08.0"W
Nossa Senhora do Socorro	10°51'21.5"S	37°11'09.6"W
Nossa Senhora do Socorro	10°51'19.1"S	37°11'12.7"W
Nossa Senhora do Socorro	10°51'06.6"S	37°11'50.9"W
Nossa Senhora do Socorro	10°51'00.3"S	37°12'04.9"W
Laranjeiras	10°46'54.2"S	37°08'28.0"W
Laranjeiras	10°46'05.6"S	37°07'04.0"W
Laranjeiras	10°46'05.6"S	37°07'04.4"W
Laranjeiras	10°46'06.0"S	37°07'05.0"W
Laranjeiras	10°46'06.0"S	37°07'05.5"W
Laranjeiras	10°46'06.7"S	37°07'06.1"W
Laranjeiras	10°46'06.7"S	37°07'06.4"W
Laranjeiras	10°46'06.8"S	37°07'06.7"W
Laranjeiras	10°46'06.8"S	37°07'06.6"W
Laranjeiras	10°46'07.0"S	37°07'06.3"W
Laranjeiras	10°46'07.2"S	37°07'06.6"W
Maruim	10°45'41.1"S	37°06'35.3"W
Maruim	10°45'42.0"S	37°06'36.9"W
Maruim	10°44'11.9"S	37°04'20.7"W
Maruim	10°44'10.1"S	37°04'14.8"W
Maruim	10°44'11.1"S	37°04'10.04"W
Maruim	10°43'48.7"S	37°03'41.6"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'08.2"S	37°00'41.2"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'13.1"S	37°00'43.9"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'12.2"S	37°00'43.4"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'11.3"S	37°00'42.9"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'08.8"S	37°00'41.6"W
Santo Amaro das Brotas	10°46'08.6"S	37°00'41.4"W
Santana do São Francisco	10°18'00.7"S	36°35'37.1"W
Santana do São Francisco	10°17'50.0"S	36°35'46.7"W
Canhoba	10°05'44.8"S	36°57'03.4"W
Canhoba	10°04'58.2"S	36°56'53.8"W
Canhoba	10°04'42.3"S	37°01'48.8"W
Canhoba	10°08'22.2"S	36°58'22.0"W
Canhoba	10°08'22.2"S	36°58'21.7"W
Canhoba	10°08'21.4"S	36°58'19.4"W
Japoatã	10°24'16.4"S	36°42'26.9"W
Pacatuba	10°24'25.4"S	36°42'17.4"W
Pacatuba	10°26'05.7"S	36°39'51.7"W

Pacatuba	10°26'04.4"S	36°39'52.9"W
Brejo Grande	10°25'49.3"S	36°28'22.0"W
Brejo Grande	10°28'09.3"S	36°29'16.8"W
Brejo Grande	10°29'28.7"S	36°34'13.2"W
Brejo Grande	10°29'28.7"S	36°34'13.2"W
Ilha das flores	10°26'18.3"S	36°31'25.6"W
Ilha das flores	10°26'48.1"S	36°31'25.8"W
Neópolis	10°18'36.2"S	36°34'58.3"W
Neópolis	10°18'33.0"S	36°34'59.7"W
Neópolis	10°18'32.8"S	36°35'00.5"W
Neópolis	10°18'44.6"S	36°34'50.3"W
Neópolis	10°18'51.8"S	36°35'11.9"W
Itabi	10°09'07.5"S	37°08'03.0"W
Feira Nova	10°22'43.8"S	37°13'34.4"W
Feira Nova	10°22'46.9"S	37°13'31.7"W
Feira Nova	10°22'22.3"S	37°14'38.6"W
Nossa Senhora das Dores	10°32'16.2"S	37°09'25.3"W
Nossa Senhora das Dores	10°31'54.1"S	37°09'20.5"W
Nossa Senhora das Dores	10°31'39.2"S	37°09'21.8"W
Nossa Senhora das Dores	10°25'11.8"S	37°11'56.3"W
Nossa Senhora das Dores	10°31'01.9"S	37°10'50.2"W
Nossa Senhora das Dores	10°32'21.1"S	37°09'32.0"W
Nossa Senhora das Dores	10°33'58.6"S	37°08'37.0"W
Nossa Senhora das Dores	10°34'00.3"S	37°08'34.5"W
Canindé de São Francisco	9°36'21.7"S	37°50'47.3"W
Frei Paulo	10°32'55.4"S	37°31'48.3"W
Itabaiana	10°39'57.8"S	37°26'45.9"W
Itabaiana	10°49'10.5"S	37°14'24.2"W
São Domingos	10°46'57.4"S	37°36'00.8"W
São Domingos	10°46'57.5"S	37°36'01.1"W
São Domingos	10°46'57.8"S	37°36'01.0"W
Rosário do Catete	10°39'30.4"S	37°01'59.6"W
Rosário do Catete	10°39'30.2"S	37°02'01.0"W
Siriri	10°36'52.5"S	37°06'06.3"W
