



RAFAELA RIBEIRO DE SOUZA

MICROPROPAGATION AND CRYOPRESERVATION OF
Genipa americana L.

LAVRAS-MG

2018

RAFAELA RIBEIRO DE SOUZA

MICROPROPAGATION AND CRYOPRESERVATION OF *Genipa americana*. L

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva,

Orientadora

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

Coorientadores

LAVRAS-MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Rafaela Ribeiro de.

Micropropagation and Cryopreservation of *Genipa americana*
L. / Rafaela Ribeiro de Souza. - 2018.
98 p. : il.

Orientador(a): Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Coorientador(a): Fernanda Carlota Nery, Diogo Pedrosa Corrêa
da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Cultivo in vitro. 2. Criopreservação de sementes. 3.
Rubiaceae. I. Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira. II. Nery, Fernanda
Carlota. III. Silva, Diogo Pedrosa Corrêa da. IV. Título.

RAFAELA RIBEIRO DE SOUZA

MICROPROPAGATION AND CRYOPRESERVATION OF *Genipa americana*. L

MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Genipa americana* L.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de março de 2018

Dra. Márkilla Zunete Beckmann Cavalcante UNIVASF

Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dr. Ítalo Herbert Lucena Cavalcante UNIVASF

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva UFLA

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

Orientadora

LAVRAS-MG

2018

*A Deus, por ser minha fonte de força e esperança, por ser
meu guia e socorro em todos os momentos,*

*Ao meu filho amado Elton Francisco, por nos dar mais
sentido à vida,*

*Aos meus queridos Pais pelo exemplo de força e trabalho, e
por mesmo diante das dificuldades e distância nunca
deixarem de sonhar comigo,*

*Ao meu esposo pela paciência, fé, amor, carinho e
motivação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita bondade, amor e misericórdia, pelo dom da vida, por ser meu conforto, refúgio e segurança, enfim, por permitir que eu chegasse até aqui!

A Nossa mãezinha do céu, pelo exemplo de humildade, fidelidade e amor, pela sua poderosa intercessão e proteção.

Ao meu pequeno Elton Francisco por me ensinar o verdadeiro sentido do amor e, por entre as inúmeras bênçãos que Deus me concedeu, ser simplesmente a melhor de todas.

A toda minha família, especialmente meus pais Moaci Alves de Souza e Eudirene Ribeiro de Souza, pela dedicação, carinho e amor, por terem me ensinado a importância de sempre dar o melhor de si, por toda força e conselhos que me ofereceram para superar as dificuldades.

Aos meus queridos irmãos: Jéssika Taiane Ribeiro de Souza e Marcos David Ribeiro de Souza, pelo apoio, carinho e amor.

Ao meu esposo Raphael Reis da Silva, pelo carinho, amor, companherismo e colaboração nos trabalhos de pesquisa.

A minha orientadora Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva pela oportunidade, por sua humildade, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, pela confiança, incentivo e pelo exemplo de profissionalismo.

A minha coorientadora Dra. Fernanda Carlota Nery pela confiança, pela segurança que sempre me passou, pelo apoio, amizade e pelas trocas de experiências principalmente quanto à maternidade.

A toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas em especial ao professor Dr. Renato Paiva pelas oportunidades oferecidas, ensinamentos e incentivos à pesquisa. Aos meus colegas especialmente, Michele Valquíria dos Reis, Diogo Pedrosa, Júnia Figueiredo, Afonso Ricardo e Rodrigo Therezan, pelo convívio, amizade, apoio e colaboração com os experimentos.

Aos meus professores, coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Fisiologia Vegetal da UFLA em especial aos professores Amauri, Luís Edson e João Paulo pelos conhecimentos transmitidos. A nossa secretária e amiga Salete por todo cuidado, carinho e disponibilidade.

Aos meus colegas e amigos das turmas de Pós-graduação em Agronomia-Fisiologia Vegetal, pelo companheirismo, amizade e força em especial ao Roniel e Lorena.

A UFLA pela oportunidade do curso e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida;

A todos.... O meu Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

RAFAELA RIBEIRO DE SOUZA, Filha de Moaci Alves de Souza e Eudirene Ribeiro de Souza, nasceu em 13 de julho de 1989 em Corrente-PI. Coursou Ensino Fundamental na Escola Estadual Desembargador João Pacheco Cavalcante Barros durante o 1º ao 4º ano e na Escola Estadual Coronel Justino Cavalcante Barros do 5º ao 8º ano. No ano de 2004 iniciou o ensino médio como bolsista do Colégio Mercedário São José. Em março de 2007 iniciou o curso de graduação em Agronomia, na Universidade Estadual do Piauí-Campus de Corrente, finalizando em fevereiro de 2012. Em março de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia-Fitotecnia na Universidade Federal do Piauí-Campus de Bom Jesus, onde realizou pesquisas sobre propagação e manejo cultural de plantas ornamentais, sob a orientação da Profa. Dra. Márkilla Zunete Beckmann Cavalcante, finalizando em março de 2014. Em agosto de 2013 foi aprovada em concurso para provimento de cargo de professor substituto na UFPI, onde lecionou pelo período de um ano as disciplinas de Fisiologia Vegetal, Fisiologia e Manejo pós-colheita, Plantas Daninhas e seu Controle, e Interpretação de Análises de Solo Recomendação de adubação e calagem, para os cursos de Agronomia, Engenharia Florestal, Biologia e Zootecnia. Em agosto de 2014, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia-Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies nativas do Cerrado com potencial ornamental, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, concluindo-o em março de 2018.

“Cultive, preserve, queira o bem. O resto vem!”

Caio Fernando Abreu

RESUMO GERAL

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie de alto potencial socioeconômico devido às diversas possibilidades de usos em projetos paisagísticos e em indústrias alimentícia, farmacêutica, nanotecnológica e madeireira. No entanto, existem várias limitações biológicas, técnicas e científicas que dificultam a conservação e desestimulam sua exploração comercial. Portanto, o cultivo *in vitro* é uma alternativa para superar as dificuldades impostas pelo sistema tradicional de propagação do jenipapeiro, permitindo a multiplicação de plantas em larga escala e o emprego de tecnologias para conservação e criopreservação. Nesse contexto, objetivou-se estabelecer um protocolo para regeneração *in vitro* e criopreservação de sementes de *Genipa americana*. Para a regeneração *in vitro*, segmentos de hipocótilo, raiz e folhas foram obtidos de plântulas estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com BAP nas concentrações de 0,0; 1,12; 2,25 e 3,37 mg L⁻¹. Para o experimento de aclimatização, plântulas enraizadas *in vitro* foram transferidas para tubetes preenchidos com substrato à base de turfa e vermiculita e foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25°C ± 2°C e irradiância de 67 μmol m⁻² s⁻¹. Após 14 dias de aclimatização em sala de crescimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com 70% de sombreamento. Aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para condições *ex vitro*, foram realizadas análises anatômicas, de crescimento e atividade de enzimas antioxidantes. Para criopreservação, as sementes de jenipapeiro foram desidratadas em sílica gel (0, 16, 18, 20, 22 e 24 horas), e em seguida, foram criopreservados em nitrogênio líquido (NL) (-196°C). Aos 40 dias de cultivo *in vitro* observou-se que o padrão morfo genético e a capacidade de regeneração *in vitro* apresentaram correlação entre a fonte de explante (hipocótilo, raiz e folha) e as concentrações de BAP utilizadas. O meio MS suplementado com 1,12 mg L⁻¹ de BAP possibilitou maior frequência de brotações em segmentos hipocótilo, raiz e folha. Os melhores resultados para a taxa de regeneração de brotos (80%) e número de plantas regeneradas por explante (5) foram obtidos utilizando segmentos de hipocótilo cultivados em meio MS + 1,12 mg L⁻¹ de BAP. Ao final de 30 dias de aclimatização houve 90% de sobrevivência das mudas. Verificou-se ainda que, as alterações morfoanatômicas e fisiológicas como emissão de novas folhas, aumento no conteúdo de clorofilas, aquisição de formato elíptico dos estômatos, sobrevivência de raízes formadas *in vitro* e a atividade estimulada de enzimas antioxidantes garantiram a continuidade do crescimento e aclimatização das plantas, possibilitando alta taxa de sobrevivência (90%) após aclimatização. Quanto à criopreservação, observou-se que, a remoção do conteúdo de água das sementes de até 14% (correspondente a 20 horas de desidratação) conferiu maior tolerância ao congelamento e favoreceu a criopreservação bem sucedida de sementes de *Genipa americana*, possibilitando além da germinação (35%) após o descongelamento, altas taxas de sobrevivência (100%), com crescimento e estabelecimento normal das mudas após a aclimatização. A metodologia estabelecida além de ser simples e de fácil execução possibilitará a conservação em longo prazo de germoplasma dessa espécie.

Palavras-chave: jenipapeiro, Rubiaceae, micropropagação, aclimatização, armazenamento em longo prazo.

GENERAL ABSTRACT

The genipapo (*Genipa americana* L.) is a species of high socioeconomic potential due to the various possibilities of use landscaping projects and in the food, pharmaceutical, nanotechnological and logging industries. However, there are several biological, technical and scientific limitations that hinder conservation and discourage its commercial exploitation. Therefore, *in vitro* cultivation is an alternative to overcome the difficulties imposed by traditional system of genipapo propagation, allowing the multiplication of plants on large scale and using technologies for conservation and cryopreservation. In this context, the aim was to establish a protocol for *in vitro* regeneration and cryopreservation of *Genipa americana* seeds. For *in vitro* regeneration, segments of hypocotyl, root and leaf were obtained from seedling established *in vitro*. The explants were inoculated in MS medium supplemented with BAP at concentrations of 0.0; 1.12; 2.25 and 3.37 mg L⁻¹. For the acclimatization experiment, plantlets rooted *in vitro* were transferred to tubes filled with substrate based of vermiculite and peat, and maintained for 14 days in a growth room under with a controlled temperature of 25°C ± 2°C and photon irradiance of 67 μmol m⁻² s⁻¹. Then, they were transferred to greenhouse with 70% shading. At 0, 7, 14, 21 and 28 days after transfer to *ex vitro* conditions, anatomical, growth and antioxidant enzyme activity analyzes were performed. For cryopreservation, genipap seeds were dehydrated on silica gel (0, 16, 18, 20, 22 and 24 hours), and then cryopreserved in liquid nitrogen (NL) (-196°C). At 40 days of *in vitro* culture it was observed that the morphogenetic pattern and the regeneration capacity showed a correlations with the explants source (hypocotyl, root and leaf) and BAP concentrations used. MS medium supplemented with 1.12 mg L⁻¹ of BAP proved a higher frequency of shoots in segments hypocotyl, root and leaf. The best results for shoot regeneration rates (80%) and number of regenerated plants per explant (5) were obtained using hypocotyl segments grown on medium MS + 1.12 mg L⁻¹ BAP. At the end of 30 days of acclimatization there was 90% survival of the seedlings. It was also verified that the morphological and physiological alterations such as the emission of new leaves, increase in chlorophyll content, elliptic shape acquisition of the stomata, root survival *in vitro* and the stimulated activity of antioxidant enzymes ensure the continuity of growth and acclimatization of plants, enabling high survival rate (90%) after acclimatization. As for the cryopreservation, it was observed that removal of seed water content up to 14% (corresponding to 20 hours of dehydration) conferred a higher tolerance to freezing and favored the successful cryopreservation of seeds of *Genipa americana*, allowing germination (35%) after thawing, high survival rates (100%), with growth and normal establishment of the seedlings after acclimatization. The established methodology, besides being simple and easy to implement, will allow the long-term conservation germplasm of this species.

Key-words: genipapo, Rubiaceae, micropropagation, acclimatization, long-term storage.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.)	17
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	19
2.4 Conservação da biodiversidade e criopreservação	22
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE	33
ARTIGO 1- Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient <i>in vitro</i> regeneration of <i>Genipa sp.</i>	34
Abstract	35
Introduction	36
Material and methods	38
Plant material	38
Effect of explants type and BAP on callus formation and adventitious shoots induction	38
Rooting	39
Acclimatization	39
Statistical analysis	40
Results	40
Effect of explants type and BAP on callus formation and adventitious shoots induction	40
Rooting	41
Discussion	42
Conclusions	45
References	46
ARTIGO 2- Alterações morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes durante a aclimatização de <i>Genipa americana</i>	58
Resumo	59
Introdução	60
Material e métodos	62
Material vegetal e condições de cultura	62
Aclimatização	62

Crescimento e índice de clorofila.....	63
Atividade de enzimas antioxidantes	64
Análises histológicas	65
Análise estatística	66
Resultados e Discussão	66
Conclusões	75
Referências	76
ARTIGO 3- Cryopreservation of <i>Genipa americana</i> seeds.....	80
ABSTRACT	81
Introduction.....	82
Material and methods.....	84
Viability after dehydration and freezing	85
Germination	85
Histological analysis.....	86
Acclimatization.....	86
Experimental design and statistical analyses	87
Results.....	87
Discussions.....	89
Conclusion	93
References.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie frutífera nativa da América do Sul e Central, pertence à família Rubiaceae, e é amplamente distribuída no Cerrado brasileiro. Possui grande importância econômica em função das inúmeras possibilidades de usos como: frutífera, devido a seus atributos de sabor, valor nutricional e medicinal; madeira para confecção de móveis e construção civil; apresenta ainda potencial paisagístico podendo ser utilizado na arborização urbana (DANTAS et al., 2009; JUDD et al., 2008). Além disso, por ser uma espécie higrófita e fitorremediadora é bastante recomendada para a recuperação de áreas degradadas (SANTANA et al., 2012). Os frutos são ricos em “genipina” um composto de baixa toxicidade com coloração azul. Essas características têm despertado o interesse para sua utilização em indústrias de cosméticos, alimentícias, farmacêuticas e nanotecnológicas (NERI-NUMA et al., 2017; RAMOS-DE-LA-PEÑA et al., 2014; SANTHOSHKUMAR et al., 2017).

Apesar do potencial socioeconômico, há diversas limitações de natureza biológica e técnico-científicas, que desestimulam a exploração comercial do jenipapeiro e dificultam sua conservação. Dentre elas, a falta de variedades e tecnologias para produção de mudas selecionadas, adicionalmente o método de propagação convencional é por sementes, com germinação lenta, baixa e desuniforme, o que limita e onera a produção de mudas. Além disso, as sementes apresentam sensibilidade à desidratação com período de viabilidade muito curta (MAGISTRALI et al., 2013; SOUZA et al., 2016). Tais características dificultam a instalação de plantios comerciais e a conservação de germoplasma desta espécie. Adicionalmente, o extrativismo predatório associado às ações como desmatamento, queimadas e mineração podem comprometer sua existência (VIEIRA; MARTINS, 2000). Neste sentido, o cultivo *in vitro* permitirá tanto a propagação massiva do jenipapeiro como possibilitar o emprego de tecnologias de conservação (ALMEIDA et al., 2016).

Algumas pesquisas já foram realizadas, visando o cultivo *in vitro* do jenipapeiro baseado na organogênese, utilizando explantes como embriões zigóticos, segmentos nodais e foliares na presença de reguladores de crescimento (ALMEIDA et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2017; SÁ et al., 2016). Entretanto, esses sistemas, apresentam baixa eficiência para regeneração de plantas e requerem longo período de tempo para obtenção de mudas. Dessa forma, há necessidade do estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* para o jenipapeiro. Além disso, é importante destacar que o sucesso final da propagação *in*

vitro depende não apenas do número de plantas regeneradas, mas, da capacidade de aclimatização dessas plantas para o ambiente *ex vitro* (SIK-SHIN et al., 2014).

Durante o processo de aclimatização as plantas micropropagadas podem desenvolver mecanismos de defesa antioxidante, de controle da transpiração e perda de água, e aperfeiçoar o processo fotossintético. Estas estratégias são constatadas por meio de observações das características fisiológicas e estruturais dos órgãos vegetativos durante o processo de transferência das condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (GONÇALVES et al., 2017; LANDO et al., 2016). Porém, informações disponíveis relacionadas às alterações fisiológicas e anatômicas durante o processo de aclimatização de plantas micropropagadas ainda são reduzidas (GONÇALVES et al., 2017; LANDO et al., 2016; OSÓRIO et al., 2013) e inexistente para o jenipapeiro.

Considerando a conservação de germoplasma, uma das formas mais eficientes é a utilização de bancos de sementes. No entanto, a conservação de germoplasma de *Genipa americana* L. por métodos convencionais, como banco de sementes não é indicada, devido suas sementes apresentarem comportamento intermediário e perda de viabilidade em curto tempo (MAGISTRALI et al., 2013; SALLA; JOSÉ; FARIA, 2016). Alternativamente, a criopreservação com uso de nitrogênio líquido, é uma ferramenta promissora para a conservação em longo prazo de germoplasma do jenipapeiro (NAIDOO et al., 2016), permitindo, além do armazenamento sem danos por tempo indeterminado, à manutenção da estabilidade genética (FOLGADO et al., 2014). Assim, diante da falta de informações e protocolos disponíveis para a criopreservação de *G. americana* é fundamental a realização de estudos visando tanto a criopreservação, como a avaliação dos efeitos do congelamento sobre o potencial regenerativo do material criopreservado e estabelecimento de mudas.

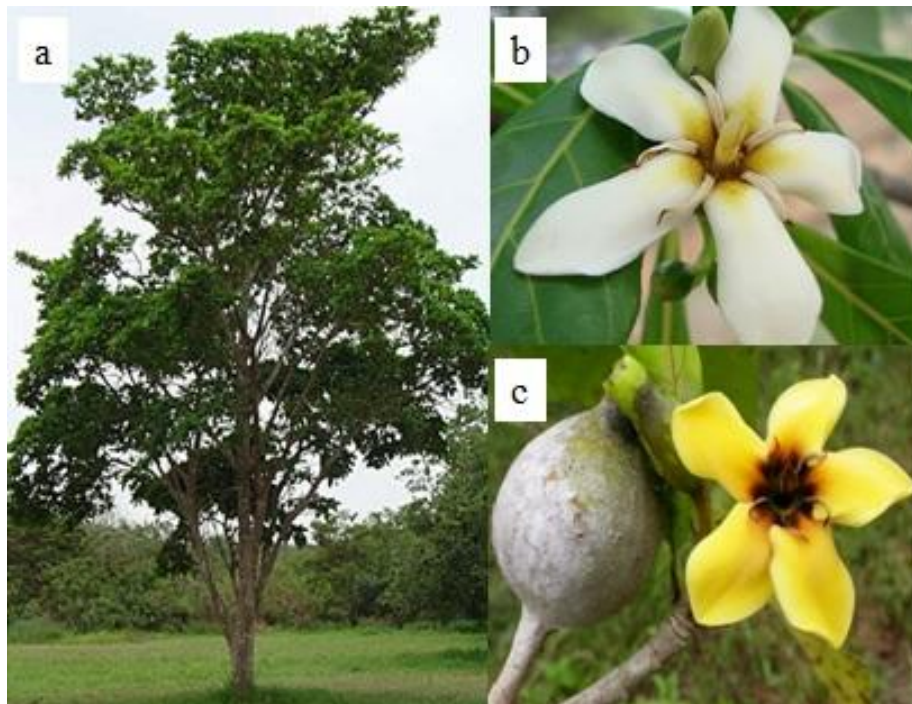
Neste contexto, objetivou-se o estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de *Genipa americana* utilizando diferentes fontes de explantes, bem como a avaliação das alterações morfofisiológicas e o comportamento das plântulas micropropagadas durante a aclimatização, além do estabelecimento de um protocolo de criopreservação de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Jenipapo (*Genipa americana* L.)

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie florestal pertencente à família Rubiaceae, originária da América do Sul e Central, sendo amplamente distribuída no bioma Cerrado brasileiro (JUDD et al., 2008). Sua madeira é empregada para confecção de móveis e em construções civil. Além disso, possui grande demanda no mercado de frutas frescas por apresentar frutos com ótimas qualidades nutricionais (importante fonte de cálcio, rico em sais minerais e vitaminas), pouco perecíveis e bastante saborosos. Sua polpa possui cerca de 50 compostos voláteis e mais da metade desses compostos caracterizam seu aroma especial (CAMPELO et al., 2017; DANTAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006). Apresenta ainda, importância ecológica devido às suas características de seletiva higrófita e fitorremediadora, sendo bastante recomendada para a recomposição de matas ciliares e recuperação de áreas degradadas. Adicionalmente, o jenipapeiro (Figura 1a) pode ser utilizado na arborização urbana, por possuir copa densa com formato piramidal, ramos curtos e flores inicialmente brancas que se tornam amareladas com a maturação (Figura 1b-c) (ALMEIDA et al., 2015a; DANTAS et al., 2009; SANTANA et al., 2012).

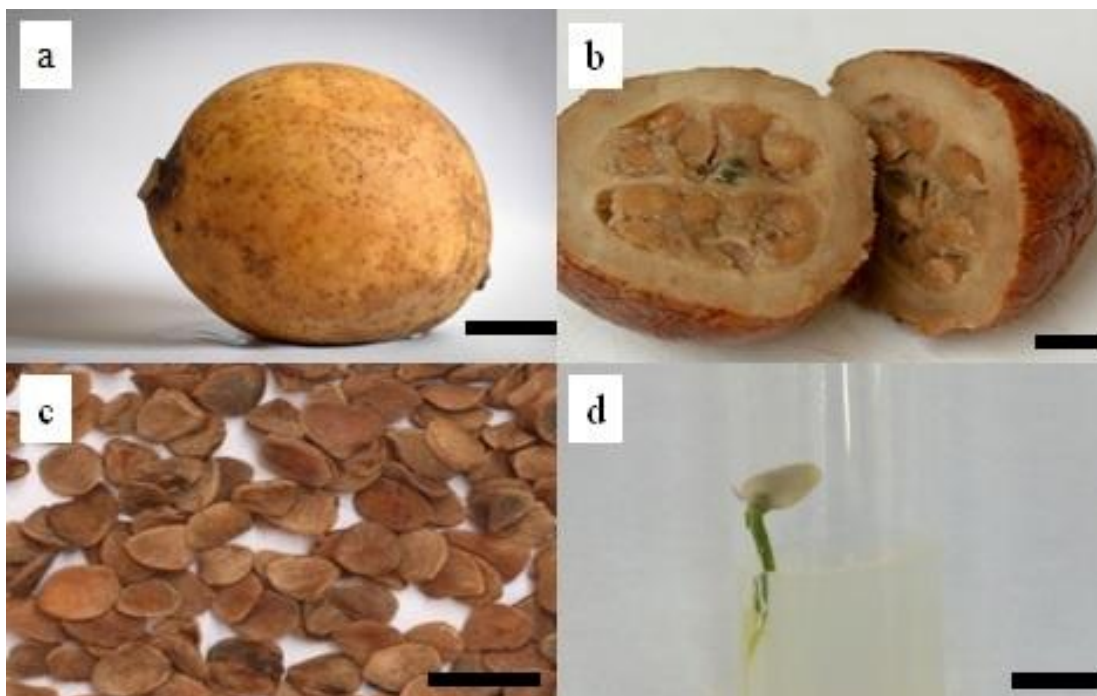
Figura 1- árvore (a) e flores de jenipapeiro (b e c).



Fonte: www.damaplantas.com.br

Os frutos do jenipapeiro (Figura 2a-b) são ricos em ‘genipina’ um composto iridóide de baixa toxicidade com coloração azul, o que tem despertado grande interesse nas indústrias como substituto de pigmentos sintéticos (BRAUCH et al., 2016; NERI-NUMA et al., 2017; RAMOS-DE-LA-PEÑA et al., 2014). Além disso, ensaios farmacológicos demonstraram o potencial de extratos de folhas de *G. americana* em aplicações médicas e farmacêuticas, com atividades de antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatório, antidiabético, anti-helmíntico e antioxidante (ALVES et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017). Relatos recentes têm apontado ainda o uso de extratos de seus frutos como alternativa para síntese de nanopartículas de ouro, por ser uma tecnologia sustentável, pela eficiência na capacidade de reduzir íons metálicos e não causar a proliferação de células cancerígenas (KUMAR et al., 2016; SANTHOSHKUMAR et al., 2017).

Figura 2- Frutos (a e b), sementes (c) e padrão germinativo de sementes de jenipapeiro (d). Barras=1cm.



Fonte: autor

Devido às diversas possibilidades de uso e à falta de conhecimento relacionado às práticas de cultivo e conservação, o jenipapeiro foi incluído em uma lista de trinta e nove espécies prioritárias no programa "Plantas para o Futuro". Essa iniciativa é resultado de compromissos internacionais assumidos pelo Brasil no Tratado Internacional sobre Recursos Genéticos de Plantas para Alimentação e Agricultura. Este programa busca promover o uso sustentável de componentes da biodiversidade nativa por meio de incentivos à produção e

diversificação de produtos agroindustriais, visando reduzir a vulnerabilidade alimentar e promover benefícios socioeconômicos (FAO, 2017; MMA, 2016).

Entretanto, há diversas limitações de natureza biológica e técnico-científicas que desestimulam a exploração comercial do jenipapeiro, como: falta de variedades e mudas selecionadas; germinação lenta, baixa e desuniforme. Além disso, as sementes (Figura 2c) apresentam comportamento intermediário, com sensibilidade à desidratação e resfriamento (com perda de viabilidade em curto prazo de até 60 dias) (MAGISTRALI et al., 2013; SOUZA et al., 2016). Tais características dificultam a instalação de plantios comerciais e conservação de germoplasma dessa espécie. Adicionalmente, o extrativismo predatório associado às ações como desmatamento, queimadas e mineração podem comprometer a existência dessa espécie (VIEIRA; MARTINS, 2000), estimulando assim, o desenvolvimento de técnicas que viabilizem a produção de mudas e conservação dessa espécie.

Neste contexto, o cultivo *in vitro* é uma técnica alternativa que possibilitará superar as dificuldades de propagação do jenipapeiro, permitindo tanto a multiplicação em larga escala de mudas, como o emprego de tecnologias de conservação, criopreservação, produção de biomassa e de recursos para o aprimoramento da produção de fitofármacos (ALMEIDA et al., 2016; BHUVANESHWARI et al., 2016).

2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais compreende um conjunto de técnicas no qual um explante é isolado e cultivado sob condições assépticas, em um meio nutritivo artificial, resultando na produção em larga escala de mudas em qualquer época do ano, em menor tempo e com melhor sanidade (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013). Possibilita ainda, o emprego de tecnologias de conservação, produção de sementes sintéticas, criopreservação, produção de biomassa e de recursos para o aprimoramento da produção de fitofármacos em espécies com potencial medicinal. Contribuindo ainda, para obtenção de germoplasma mais competitivo e adaptado aos diversos métodos de cultivos (ALMEIDA et al., 2016).

A capacidade de desdiferenciação celular é uma das características mais importantes do cultivo *in vitro*. Além disso, o processo de indução varia dentro das células da mesma planta, e depende de sua capacidade de responder a estímulos hormonais, composição do meio de cultura e ambiente de cultivo (ALMEIDA et al., 2015b; PINHAL et al., 2011; SHEMER et al., 2015). Por meio da micropropagação é possível obter resultados positivos visando solucionar problemas relacionados à germinação das sementes e ainda possibilitar a

propagação massiva do jenipapeiro. Porém, essa técnica só pode ser considerada viável quando for possível regenerar o genótipo desejado e as plantas obtidas forem capazes de serem transferidas para o ambiente *ex vitro* em grande escala, a baixo custo e com altas taxas de sobrevivência (CEZAR et al., 2015; SIK-SHIN et al., 2014).

Normalmente, o jenipapeiro é propagado por sementes, no entanto além desse tipo de propagação limitar o número de mudas produzidas, há diversos relatos de que o processo germinativo é desuniforme podendo variar entre 30 a 120 dias, o que dificulta a obtenção de plântulas homogêneas (ALMEIDA et al., 2015a; SÁ et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Poucos estudos demonstram a possibilidade do uso da micropropagação para essa espécie baseadas na organogênese utilizando principalmente como explantes, embriões zigóticos, segmentos nodais e foliares na presença de reguladores de crescimento de plantas como auxinas e citocininas (ALMEIDA et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2017; ROCHA et al., 2008; SÁ et al., 2016; YEE et al., 2010). No entanto, não há relatos sobre as respostas morfogênicas de diferentes explantes, que apresente vantagens especialmente no aumento do potencial de regeneração e na redução do tempo necessário para obtenção de mudas.

A indução de respostas morfogênicas em diferentes explantes de *G. americana* foi relatada primeiramente por Yee et al. (2010), no entanto esse relatório não apresenta informações sobre a eficiência de regeneração de plântulas e detalhes sobre os reguladores de crescimento utilizados com suas respectivas concentrações. Adicionalmente, Almeida et al. (2015a) relataram respostas morfogênicas de *G. americana*, utilizando explantes foliares e segmentos nodais, porém os resultados revelaram baixa eficiência de regeneração (37%) e um longo período para a obtenção de brotações adventícias (120 dias) não havendo relatos da regeneração de plântulas completas.

Verifica-se portanto, que os sistemas existentes de regeneração *in vitro* para o jenipapeiro, além de apresentar baixa eficiência para regeneração (37%) requerem aproximadamente 8 meses para obtenção de mudas, que além de ser considerado um período longo é similar ao período de obtenção das mudas pelo método convencional (via sementes) (MMA, 2016; ROCHA et al., 2008). Neste contexto há a necessidade de adaptação ou o estabelecimento de protocolos de regeneração *in vitro* que viabilizem a produção de mudas de forma mais rápida e eficiente. Além disso, é importante destacar que o sucesso final da propagação *in vitro* depende não apenas do número de plantas regeneradas, mas, da capacidade das plântulas obtidas de serem transferidas para o ambiente *ex vitro* (SIK-SHIN et al., 2014).

A aclimatização constitui uma das fases mais críticas da micropropagação, pois nesse momento as plantas devem apresentar o potencial de se reajustar para um estado

autotrófico e corrigir as anormalidades (estômatos não funcionais, sistema vascular incompleto, capacidade fotossintética limitada) ocasionadas pelo cultivo *in vitro* assegurando sua adaptação e sobrevivência ao novo ambiente (ASAYESH et al., 2017).

Na fase de transplante das plantas enraizadas *in vitro*, o estresse hídrico é geralmente o principal problema, devido ao fato das plantas serem submetidas a uma condição de alta transpiração, que associada à alta condutividade hidráulica, provoca baixa funcionalidade ou ausência de controle sobre o fechamento dos estômatos (LANDO et al., 2016; POSPÍŠILOVÁ et al., 2007; RODRIGUES et al. 2015; SIK-SHIN et al., 2014). Além da dificuldade no controle da transpiração em decorrência de estômatos não funcionais, a camada de cera cuticular é mínima ou inexistente e a conexão vascular entre sistema vascular de caule e raízes adventícias é precário para permitir um fluxo transpiratório adequado (CHAARI-RKIHIS et al., 2015).

Assim, como estratégia adaptativa, as plantas micropropagadas durante o processo de aclimatização devem desenvolver mecanismos de controle da transpiração, ativar mecanismos de controle de perda de água e aperfeiçoar o processo fotossintético. Estas estratégias podem ser constatadas por meio de observações das características estruturais dos órgãos vegetativos (folhas e raízes) durante o processo de transferência das condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (LANDO et al., 2016).

Embora as plantas cultivadas *in vitro* pareçam ser normais é improvável que sejam fotossinteticamente ativas, pela presença de sacarose no meio de cultivo. Além disso, são ineficientes no controle de perda de água o que as tornam mais vulneráveis ao choque de transplante para condições *ex vitro* (SIK-SHIN et al., 2014). Assim, quando transferidas, a exposição brusca a uma condição de atmosfera com maior disponibilidade de irradiação e baixa umidade tornam as plantas mais susceptíveis ao estresse, e morte durante a aclimatização (CHAARI-RKIHIS et al., 2015). Essas tensões podem reduzir a capacidade do sistema fotossintético em utilizar a radiação incidente, levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo (ARAGON et al., 2010; GONÇALVES et al., 2017).

O oxigênio molecular em seu estado fundamental não é reativo, porém ele é capaz de dar origem a estados reativos e letais de O_2 (EROs). As EROs incluem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), que são formados por meio de reações de transferência de elétrons. A formação de EROs é inevitável e ocorre continuamente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (GARG; MANCHANDA, 2009). Porém, altas concentrações de EROs podem levar à fitotoxicidade enquanto que concentrações relativamente baixas podem ser utilizadas para sinalização de aclimatização, o

que confere extrema importância à regulação do conteúdo de EROs nas plantas. Portanto, para minimizar os danos causados pelas EROs as células possuem um mecanismo de defesa antioxidante constituído por enzimas e compostos orgânicos; sendo o sistema enzimático formado por enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (GONÇALVES et al., 2017; GILL;TUTEJA, 2010).

A SOD representa a primeira linha de defesa contra EROs, transformando superóxido em H_2O_2 sendo encontrada nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, citosol e apoplasto. Já a CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos apresentando pouca ou nenhuma atividade no citosol, mitocôndrias e cloroplasto. Essa enzima não utiliza poder redutor para sua atividade e possui alta taxa de reação e menor afinidade pelo H_2O_2 comparado a APX (GARG; MANCHANDA, 2009; SHARMA et al., 2012).

As informações disponíveis referentes às alterações fisiológicas e anatômicas que ocorrem durante o processo de aclimatização de plantas micropropagadas são poucas (GONÇALVES et al., 2017; LANDO et al., 2016; OSÓRIO et al., 2013; SIK-SHIN et al., 2014) e inexistente para *G. americana*. No entanto, o sucesso no processo de aclimatização depende da capacidade de reajuste fisiológico das plantas a fim de contornar os desequilíbrios causados pela sua transferência para o ambiente *ex vitro*, e das alterações morfoanatômicas que asseguram a adaptação e sobrevivência em condições de ambiente *ex vitro* (KONDAMUDI et al., 2017; LANDO et al., 2016; LIMA-BRITO et al., 2016). Portanto, estudos que possibilitam a aquisição de informações relacionadas às alterações fisiológicas e anatômicas ocorridas durante a aclimatização são de bastante interesse, pois, tal conhecimento é pré-requisito para o desenvolvimento de protocolos eficientes de aclimatização e, conseqüentemente, para o sucesso na micropropagação.

2.4 Conservação da biodiversidade e criopreservação

A adoção de práticas de conservação tem visado à diminuição do impacto causado na biodiversidade, com estratégias que se baseiam na conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* ocorre no habitat natural da planta como em reservas e parques ecológicos. No entanto, esse tipo de reserva pode ser comprometido pela incidência de pragas e doenças, queimadas e outros eventos ocasionais. Já a conservação *ex situ* é realizada fora do habitat natural como em bancos de germoplasmas, ou mesmo combinando os métodos de maneira complementar (GANEM, 2010; ENGELMANN, 2011).

Uma das formas mais eficientes de conservação da biodiversidade é a utilização de bancos de sementes. No entanto, a conservação em banco de sementes de *Genipa americana*

não é indicada, pois, suas sementes apresentam comportamento intermediário e perdem a viabilidade em curto espaço de tempo (ENGELMANN, 2011; MAGISTRALI et al., 2013). Dessa forma, as técnicas de micropropagação destacam-se por permitir a conservação da biodiversidade de espécies comerciais e nativas, oferecendo possibilidades alternativas de grande interesse como o cultivo *in vitro* (SOUZA et al., 2009).

Dentre as inúmeras vantagens da conservação *in vitro* têm-se o requerimento de pequeno espaço para armazenamento, facilidade de manipulação do material biológico, facilidade no intercâmbio de material biológico e redução da erosão genética (ENGELMANN, 2011). No entanto, mesmo sob condições de crescimento lento com reduções na temperatura e modificações na composição do meio de cultivo, o material biológico pode ser armazenado somente em médio prazo, havendo a necessidade da realização de subcultivos (SANTANA-BUZZY et al., 2007). Por outro lado, a criopreservação é uma técnica que além de possibilitar o armazenamento de material biológico em espaço reduzido por um longo período de tempo, requer o mínimo de subcultivos (ENGELMANN, 2011; SAN JOSÉ et al., 2015; SANTANA-BUZZY et al., 2007).

A criopreservação é caracterizada pela conservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas (-196°C) com uso de nitrogênio líquido ou em sua fase de vapor (aproximadamente -150°C). Sob tais condições, as reações metabólicas paralisam, e desta forma o material vegetal pode ser conservado sem danos por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2011; FOLGADO et al., 2014). A técnica pode ser aplicada em diferentes explantes: protoplastos, suspensões celulares, calos embriogênicos, ápices caulinares, gemas laterais, sementes, embriões zigóticos e somáticos. Além disso, é uma alternativa promissora para a conservação em longo prazo de germoplasma recalcitrante ou intermediário, como do jenipapeiro (BENSON, 2008; NAIDOO et al., 2016).

O sucesso neste método depende da prevenção de danos letais às membranas e organelas celulares, que estão associados às características de conteúdo e expansão da água durante o congelamento e a conformação de cristais de gelo dentro das células (WESLEY-SMITH et al., 2015). Assim, a desidratação do explante antes do congelamento é fundamental, no entanto, deve ser realizada de forma controlada, pois, a desidratação extrema pode causar a morte celular e o subsequente reestabelecimento dos processos metabólicos requer certa quantidade de água (NINAGAWA et al., 2016).

A desidratação pode ser realizada tanto pela exposição do material à sílica gel ou câmara de fluxo laminar, quanto pelo uso de substâncias crioprotetoras (glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido, prolina, sacarose, manitol, polietilenoglicol) que provocam a desidratação

osmótica do material (SANTOS, 2004). Porém, a desidratação conferida pela exposição do material em sílica gel é um dos métodos mais vantajoso pelo baixo custo, fácil execução, e por possibilitar que o material dessecado seja preservado diretamente em nitrogênio líquido sem o uso de crioprotetores, que possam apresentar toxicidade as células (PRADA et al., 2015; SISUNANDAR et al., 2010; WU et al., 2013). Além disso, é uma técnica que tem se mostrado efetiva na criopreservação de sementes de diversas espécies (PINTO et al., 2016; WU et al., 2013).

A formação de cristais de gelo durante a criopreservação provoca danos às paredes e membrana plasmática das células, com extravasamento de material citoplasmático e ruptura do envelope nuclear, levando à morte celular. Plasmólises também têm sido observadas confirmando a ocorrência de perda de água durante a criopreservação (BARRACO et al., 2014; FREITAS et al., 2016; WESLEY-SMITH et al., 2015). Após o descongelamento, as células vivas anteriormente plasmolisadas retornam em pouco tempo a sua turgidez e atividade promovendo a retomada de crescimento do explante. Dessa forma, a integridade e viabilidade celular têm sido utilizadas como indicativo de sobrevivência e como forma de antecipação dos resultados, correlacionando positivamente com a regeneração pós-descongelamento (BARRACO et AL., 2014; FREITAS et al., 2016)

Os danos celulares decorrentes da criopreservação podem comprometer a sobrevivência e/ou a completa regeneração dos explantes em plantas normais. Geralmente, o material criopreservado é avaliado apenas quanto à sobrevivência e potencial de regeneração, no entanto, é necessário que também sejam avaliados os aspectos relacionados aos danos celulares, a integridade genética e o seu grau de proximidade com o fenótipo normal não criopreservado (WEN et al., 2012). Pois apesar de ser um método reportado como eficaz na preservação da integridade genética (CARMONA-MARTÍN et al., 2018), estudos têm demonstrado a existência de variação somaclonal em espécies criopreservadas, indicando que pré-tratamentos agressivos como o uso de crioprotetores podem ser a causa de tal variação (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2016; HARDING, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2005). O que reforça a vantagem pela escolha de métodos como a desidratação em sílica, que além de ser eficiente e não apresentar a necessidade do uso de substâncias crioprotetoras, possibilita a regeneração do material criopreservado e a manutenção da integridade celular e genética.

O uso de material vegetal sob a forma de sementes e embriões zigóticos são os preferidos e vem sendo utilizado com sucesso para criopreservação do cafeeiro que também é uma Rubiaceae com sementes de comportamento intermediário (FREITAS et al., 2016; PINTO et al., 2016). A preferência pela utilização dessas estruturas tem sido atribuída ao fato de constituir um sistema mais organizado, e possibilitar a formação de uma planta inteira

dispensando etapas mais complexas de cultivo *in vitro*, como indução de brotações, multiplicação e enraizamento (BALLESTEROS et al., 2014).

Diferentes protocolos de criopreservação já foram empregados em inúmeras espécies nativas e comerciais como *Handroanthus serratifolius* (SOUZA et al., 2014), *Zinnia elegans* (PRUDENTE et al., 2015) e *Coffea arabica* (FREITAS et al., 2016; PINTO et al., 2016). Estes protocolos diferem quanto às técnicas de criopreservação e o tipo de explante. No entanto, não há informações disponíveis para a criopreservação de jenipapeiro.

Neste contexto, a impossibilidade de armazenamento em longo prazo de sementes de *G. americana*, aliado a pouca disponibilidade de informações relacionadas à criopreservação e tolerância ao congelamento, torna fundamental a realização de estudos visando o estabelecimento de protocolos de criopreservação, bem como à avaliação dos efeitos do congelamento e dessecação sobre a integridade celular, potencial regenerativo e estabelecimento de mudas para essa espécie.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. S. et al. Respostas morfo genéticas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 1, p. 58-64, 2015a.
- ALMEIDA M. et al. Plant morphogenesis: theoretical bases. **Advances in Forestry Science**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2015b.
- ALMEIDA, L. V. S. et al. Plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. **Textura**, v. 9, n. 16, p. 1-14, 2016.
- ALVES J. S. F. et al. Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 641-644, 2017.
- ARAGÓN, C. et al. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 237-244, 2010.
- ASAYESH, Z. M.; VAHDATI, K.; ALINIAEIFARD, S. Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of *in vitro* walnut plants. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 1-7, 2017.
- BALLESTEROS, D. et al. Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation. **Cryobiology**, v. 69, n. 1, p. 100-109, 2014.
- BARRACO, G. et al. Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. **Protoplasma**, v. 251, n. 1, p. 177-189, 2014.
- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, p. 15-32, 2008.
- BHUVANESHWARI, K. et al. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. in vitro culture be a potential source of secondary metabolites? **Food Chemistry**, v. 194, n. 4, p. 55-60, 2016.
- BRAUCH, J. E. et al. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, p. 391-398, 2016.

CAMPELO, S. et al. Utilização da madeira de *Genipa americana* para produção de painéis de colagem lateral – EGP. **Floresta**, v. 47, n. 1, p.129-135, 2017.

CARMONA-MARTÍN, E. Cryopreservation of rhizome buds of *Asparagus officinalis* L. (cv. Morado de Huétor) and evaluation of their genetic stability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2018. Disponível on-line: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1392-y>

CEZAR, T.M. et al. Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda* L. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 1, p. 13-22, 2015.

CHAARI-RKHIS, A. et al. Photosynthesis parameters during acclimatization of *in vitro*-grown olive plantlets. Brief communication. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 613-616, 2015.

DANTAS, A. C. V. L. et al. Jenipapo. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. EMBRAPA, p. 275- 291, 2009.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

FAO. **The future of food and agriculture: Trend and challenges**. Rome, p.180, 2017.

FOLGADO, R. et al. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 432-441, 2014.

FREITAS, R. T. et al. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445-451, 2016.

GANEM, R. S (org.). **Conservação da biodiversidade: Legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara do Deputados, Edições Câmara, p. 437, 2010.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v. 143, p. 81-96, 2009.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GONÇALVES, S.; MATINS, N.; ROMANO, A. Physiological traits and oxidative stress markers during acclimatization of micropropagated plants from two endangered plantago

- species: *P. algarbiensis* Samp. and *P. almogravensis* Franco. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 249-255, 2017.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E. et al. Effect of antioxidants on the genetic stability of cryopreserved mint shoot tips by encapsulation–dehydration. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 127, p. 359-368, 2016.
- HARDING, K . Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **Cryo Letter**, v. 25, p. 3-22, 2004.
- JUDD, W. S. et al. **Plant systematics**. Sunderland: Sinauer, p. 527-518, 2008.
- KONDAMUDI, R. et al. Role of Antioxidant Enzymes in Acclimatization of *Ceropegia spiralis* Wt., *C. pusilla* Wt. and Arn. and *C. juncea* Roxb. **International Journal of Advanced Research in Botany**, v. 3, n. 1, p. 19-27, 2017.
- KUMAR B. et al. One pot phytosynthesis of gold nanoparticles using *Genipa americana* fruit extract and its biological applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 725-731, 2016.
- LANDO, A. P. et al. Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 219-225, 2016.
- LIMA-BRITO, A. et al. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *Mucugensis*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016.
- MAGISTRALI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual e potencial: Plantas para o futuro-Região Centro-Oeste**. Brasília-DF, 2016, 1161p.
- NAIDOO, C. et al. The role of reactive oxygen species and antioxidants during precooling stages of axis cryopreservation in recalcitrant *Trichilia dregeana*. **Botany**, v. 94, n. 5, p. 391-403, 2016.

NERI-NUMA, I. A. et al. Review: Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271-279, 2017.

NINAGAWA, T. et al. A study on ice crystal formation behavior at intracellular freezing of plant cells using a high-speed camera. **Cryobiology**, v. 73, n. 1, p. 20-29, 2016.

OLIVEIRA, A. L. et al. Elemental contents in exotic Brazilian tropical fruits evaluated by energy dispersive x-ray fluorescence. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 82-84, 2006.

OLIVEIRA, A. C. A. et al. In vitro morphogenic response from zygotic embryos of *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, p. 1-3, 2017.

OSÓRIO, M. L. et al. Morphological, physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfer of micropropagated *Tuberaria major* plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 115, p. 85-97, 2013.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: **The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forest, animal and fishery genetic resources in developing countries**. FAO, Turin, Italy, p. 43-54, 2005.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 32-39, 2013.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 380-389, 2016.

POSPÍŠILOVÁ, J. et al. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. **Acta Horticulture**, v. 748, p. 29-38, 2007.

PRADA, J.A. et al. Cryopreservation of Seeds and Embryos of *Jatropha curcas* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 1, p. 172-180, 2015.

PRUDENTE, D. O. et al. In vitro germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 243-250, 2015.

- RAMOS-DE-LA-PEÑA, A. M. et al. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2014.
- ROCHA, D. I. et al. Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 69–78, 2012.
- RODRIGUES, M. et al. Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etilingera Elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 4, p. 495-504, 2015.
- SÁ, F. P. et al. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.
- SÁ, F. P. et al. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p. 155-163, 2016.
- SALLA, F.; JOSÉ, A. C.; FARIA, J. M. R. Análise ecofisiológica de *Genipa americana* L. em banco de sementes induzido. **Cerne**, v. 22 n. 1, p. 93-100, 2016.
- SAN JOSÉ, M. Del C. et al. Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 3, p. 489-499, 2015.
- SANTANA, K. B. et al. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, n. 2, p. 35-42, 2012.
- SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 6, p. 507-520, 2007.
- SANTHOSHKUMAR, J.; RAJESHKUMAR, S.; VENKAT KUMAR, S. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles – A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 11, p. 46-57, 2017.
- SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 23 p.

SHARMA, V. et al. Review: Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHEMER, O. et al. Competency for shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants is regulated by DNA methylation. **Plant Science**, v. 238, p. 251-261, 2015.

SIK-SHIN, K.; PARK, S.Y.; PAEK, K. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26- 33, 2014.

SISUNANDAR. et al. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, v. 61, n.3, p.289-296, 2010.

SOUZA, A. S. et al. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009, p.24.

SOUZA, A. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Handroanthus serratifolius* embryos. **Acta Horticulture**, v. 1039, p. 181-186, 2014.

SOUZA, R. R. et al. Optimizing of the *in vitro* jenipapo seeds germination process. **Ciência e Agrotecnologia**, v.40, n. 6, p. 155-163, 2016.

VASCONCELOS, A. L. et al. Anatomical characterization of ultra-structures, biominerals and histolocalization of metabolites in leaves of *Genipa americana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 541-548, 2017.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M. V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323–335, 2012.

WESLEY-SMITH, J. et al. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of Botany**, v. 115, n. 6, p. 991- 1000, 2015.

WU, R.Y. et al. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. **Scientia Horticulturae**, v. 157, n. 7, p. 108–112, 2013.

YEE, T.F; GOH, C.I; RAO, A.N. *In vitro* studies on *Genipa americana*. **Journal Tropical Medicinal Plants**, v. 11, p. 71-88, 2010.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1- Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *in vitro* regeneration of *Genipa sp.*

Submetido ao periódico: Plant Cell, Tissue and Organ Culture

**Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *in vitro*
regeneration of *Genipa sp.***

Rafaela Ribeiro de Souza¹^{ORCID-0000-0002-7706-4390}, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva², Raphael
Reis da Silva³, Michele Valquíria dos Reis¹, Diogo Pedrosa Corrêa da Silva², Renato Paiva¹

¹Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil * Corresponding author: rfag.fisio@gmail.com

²Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

³Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

Abstract *Genipa americana L.* is a species with high economic potential with considerable promise in the fruit, medicinal and agroindustrial fields. The *in vitro* cultivation of genipapo is an alternative that may overcome the difficulties imposed by the traditional propagation system, allowing the multiplication of plants on a large scale and using technologies in conservation programs and to improve phytopharmaceutical production. In this context, the aim of this work was to evaluate the morphogenetic potentials of different sources of explants to establish an efficient system for *in vitro* regeneration of *G. americana*. For callus regeneration and induction, segments of hypocotyl, root and leaf from *in vitro* established seedlings were used. The explants were inoculated in MS medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) at concentrations of 0.0, 1.12, 2.25 and 3.37 mg L⁻¹. The morphogenetic pattern and regeneration capacity showed correlations with the explant source and BAP concentration. MS medium supplemented with 1.12 mg L⁻¹ BAP proved to be optimum for adventitious shoots induction in segments hypocotyl, root and leaf. It was possible to obtain a efficient protocol for the *in vitro* regeneration of *G. americana* that allowed high shoot regeneration rates (80%) using hypocotyl segments with low

concentrations of BAP (1.12 mg L^{-1}). The plantlets obtained with this protocol showed a high capacity for transference to the *ex vitro* environment, presenting 90% survival at the end of 30 days of acclimatization.

Keywords Rubiaceae; Micropropagation; woody plants; growth regulators; *in vitro* culture.

Introduction

The genipapo (*Genipa americana* L.) is a forest species native to South and Central America belonging to the family Rubiaceae and is widely distributed in the Brazilian Savana biome. The fruits are rich in genipin, a low-toxicity iridoid compound capable of developing blue coloration, which has aroused great interest in industry as a substitute for synthetic pigments (Brauch et al. 2016; joint FAO and WHO Expert Committee on Food Additives 2017). Additionally, recent reports have pointed to the use of *G. americana* fruit extracts as an alternative to the synthesis of gold nanoparticles (Neri-Numa et al. 2017; Santhoskumar et al. 2017). This species also shows great ecological importance as a selective hygrophyte and for phytoremediation, being recommended for the recovery of degraded areas and restoration of riparian forests (Santana et al. 2012). In addition to its ecological importance, studies have demonstrated the potential of *G. americana* in medical and pharmaceutical applications with antibacterial, antitumor, anti-inflammatory, antidiabetic, anthelmintic and antioxidant activities (Vasconcelos et al. 2017; Alves et al. 2017).

Due to the various possibilities of its use and the lack of knowledge related to its cultivation and conservation practices, *G. americana* was included in a list of thirty-nine priority species in the "Plants for the Future" program. This initiative is a result of international commitments made by Brazil in the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. This program seeks to promote the sustainable use of

components of native biodiversity through incentives to produce and diversify agroindustrial products, aiming at reducing food vulnerability and promoting socioeconomic benefits (MMA 2016; FAO 2017).

However, there are several biological, technical and scientific limitations that hinder *ex situ* conservation and discourage commercial exploitation; for example, conventional propagation is by seeds, which present slow, low and uneven germination, and variety identification and technologies for the production of quality seedlings are lacking (Magistrali et al. 2013; Souza et al. 2016). In this way, *in vitro* cultivation is an excellent alternative to overcome the difficulties imposed by the traditional system of genipapo propagation, allowing the multiplication of plants on a large scale in a shorter time and using technologies for conservation, cryopreservation, and biomass production as resources for the improvement of phytopharmaceutical production (Bhuvaneshwari et al. 2016; Prudente et al. 2017; Silva et al. 2018).

Some *in vitro* regeneration systems for *G. americana* have already been established using mainly explants as leaf segments and nodal segments with auxins and cytokinins (Rocha et al. 2008; Almeida et al. 2015; Sá et al. 2016). However, there is no reports on the morphogenic responses of different explants, which have particular advantages in increasing the regeneration potential and the ability of the seedlings obtained to be transferred to the *ex vitro* environment. Induction of morphogenic responses of different *G. americana* explants was first reported by Yee et al. (2010) but the report lacks information on the efficiency of regeneration of complete plantlets and details about growth regulators used and its concentrations. Recently, Almeida et al. (2015) reported the morphogenic responses of *G. americana*, using leaf segments and nodal segments explants; however, the results showing low regeneration efficiency (37%), require a long period to obtain adventitious shoots (120 days) and no report regeneration of complete plantlets.

The process of morphogenetic induction depends on external and internal factors, such as exogenously applied plant growth regulators (PGRs) and the ability of the plant tissue to perceive and respond to PGRs. Thus, during adventitious organogenesis, new organs may develop from explants of different plant tissues, such as leaves, stems and roots. However, the responses of *in vitro* cultures may vary depending of the plant growth regulators applied (Magyar-Tábori et al. 2010; Lee and Pijut 2017). Thus, an efficient *in vitro* regeneration protocol depends on suitable explant selection and on the growth regulators used, which should provide greater callus induction and plant regeneration (Manoharan et al. 2016). In this context, the aim of this work was to develop an efficient system for the *in vitro* regeneration of *Genipa americana* by evaluating the morphogenetic potentials of different explants.

Material and methods

Plant material

G. americana L. seedlings were obtained by *in vitro* seed germination following a protocol described by Souza et al. (2016). The seeds were presoaked in distilled water for 48 h and then disinfected in 2.5% (v/v) NaOCl solution for 20 min. After disinfection, the seeds were inoculated in germination medium ($\frac{1}{2}$ MS salts + 15 g L⁻¹ sucrose and 0.7% agar) and kept in the dark for 16 days. After this period, the material was transferred to growth rooms under controlled conditions of temperature (25 °C), relative humidity (70%) and luminous intensity (36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Effect of explants type and BAP on callus formation and adventitious shoots induction

Segments of hypocotyl (1.0 cm), root (1.0 cm) and leaf (0.5 × 0.5 cm) were obtained from *in vitro* germinated genipapo seedlings after 45 days of culture. The explants were inoculated in MS medium (Murashige and Skoog 1962) with 3% sucrose, 0.7% agar and 6-

benzylaminopurine (BAP) at concentrations of 0.0, 1.12, 2.25, and 3.37 mg L⁻¹ (Almeida et al. 2015). The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 120 °C for 20 min. After inoculation, the cultures were kept in a growth room at a temperature of 25 °C, relative humidity of 70%, and light intensity of 36 µmol m⁻² s⁻¹, with a 16 h photoperiod. The experiment was performed in a completely randomized factorial design of 3 (explants) x 4 (BAP). Each experimental unit consisted of 10 test tubes with 1 explant each, and there were 3 replicates, totaling 30 plots per treatment. After 40 days of culture, callus formation, shoot and root regeneration, and the number of regenerated plants per explant were evaluated.

Rooting

Shoots of 2.0 cm in length were inoculated in different culture media; medium 1, consisting of WPM salts (Lloyd and McCown 1980), and medium 2, consisting of MS salts (Murashige and Skoog 1962). All media were supplemented with 3% sucrose, 0.25% phytigel and indole-3-butyric acid (IBA) at concentrations of 0, 1, 2, 3, and 4 mg L⁻¹ (Rocha et al. 2008). The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 120 °C for 20 min. After inoculation, the cultures were kept in a growth room at 25 °C, relative humidity of 70%, light intensity of 36 µmol m⁻² s⁻¹ and a 16 h photoperiod. The experiment was performed in a completely randomized factorial design of 2 (culture media) x 5 (IBA). Each experimental unit consisted of 10 test tubes with 1 explant each, and there were 3 replicates per treatment. After 45 days, rooting rate, root length, and callus formation were evaluated.

Acclimatization

Plantlets rooted under *in vitro* conditions after 60 days of incubation in rooting medium were removed from test tubes, and their roots were washed in running water for the removal of excess culture medium. The plantlets were then transferred to 250 mL tubes filled with substrate based of vermiculite and peat, and remained covered with plastic wrap in the first 15

days. Irrigation with nutrient solution composed of one-half concentration MS salts was performed once a week. The seedlings were kept for 14 days in a growth room with a controlled temperature of 25 ± 2 °C and photon irradiance of $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Then, they were transferred to a greenhouse with 70% shading. After 30 days, the survival rate was evaluated.

Statistical analysis

The data, expressed as a percentage, were transformed using \sqrt{x} . All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the statistical software Sisvar 4.3 (Ferreira 2014) to diagnose significant effects by the F test, and the averages were compared by the Scott-Knott test ($P < 0.05$).

Results

Effect of explants type and BAP on callus formation and adventitious shoots induction

When BAP was added to the culture medium, it was observed that the concentration of 3.37 mg L^{-1} promoted a high frequency of callus formation in hypocotyl segments (100%), roots (100%) and leaves (75%) (Fig. 1). Callus formation began 5 to 8 days after inoculation in regions close to the cut surfaces of the explants, and the calluses generally showed a compact texture with green coloration (Fig. 2). In addition, on the foliar segments, organogenic nodules were observed when the culture medium was supplemented with 1.12 mg L^{-1} BAP. These nodules gave rise to adventitious shoots after 40 days of incubation (Fig. 2b). It was also observed that segments of root cultured in medium supplemented with 3.37 mg L^{-1} BAP showed the presence of secondary callus with a friable structure (Fig. 2l).

The frequency of explant with regeneration of adventitious shoots was higher for hypocotyl segments and depended on BAP concentration (Fig. 2). Additionally, the frequencies of shoot regeneration obtained in the absence of BAP (75%) and at concentrations of 1.12

(80%) and 2.25 mg L^{-1} (60%) did not differ among themselves. Supplementation of the culture medium with 3.37 mg L^{-1} BAP showed an inhibitory effect on shoot regeneration from hypocotyl segments, reducing it by approximately 46.6% compared to that of the control. In leaf and root segments, the maximum frequency of shoot induction was observed in culture medium supplemented with 1.12 mg L^{-1} BAP (Fig. 3).

The number of regenerated plants per explant was higher in hypocotyl segments (5.05) in culture medium supplemented with 1.12 mg L^{-1} BAP. Moreover, the effect of BAP concentration varied as a function of explant source. In the absence of BAP, there was no plant regeneration from leaf segments, and the number of regenerated plants was increased by the use of 1.12 mg L^{-1} BAP, whereas there was no effect of BAP on root segments (Fig. 4). In addition, the use of higher BAP concentrations (3.37 mg L^{-1} BAP) was not effective for any type of explant.

Rooting

The highest rooting rate (90%) and root length (7.63) were obtained in the absence of IBA in WPM medium (data not shown). Callus formation occurred at the base of the shoots in both MS and WPM medium, with a frequency dependent on IBA concentration. All the shoots inoculated in WPM medium in the presence of IBA produced callus in all tested concentrations. In MS medium, the highest frequency of callus formation was observed at the concentration of 2 mg L^{-1} IBA (100%) (Fig. 5).

Callus formation at the base of the shoots started 10 to 15 days after inoculation, presenting a friable texture and coloration ranging from cream to translucent white (Fig. 6). The plantlets showed a normal growth habit without morphological changes (Fig. 6e-g). These seedlings were transferred successfully to plastic pots filled with commercial substrate, showing 90% survival after 30 days of acclimatization. In total, the time required to obtain plants from shoot induction to final acclimatization was approximately 130 days.

Discussion

The morphogenetic pattern and the regeneration capacity showed correlations with explant source (hypocotyl, leaves and roots) and BAP concentration. In general, all explants showed high frequencies of callus formation when cultured in MS medium supplemented with 3.37 mg L⁻¹ BAP. Furthermore, all explants of genipapo showed high regeneration capacity with the addition of low BAP concentrations (1.12 mg L⁻¹), which is extremely advantageous, since it reduces the cost of growth regulators. In addition can reduce the incidence of physiological disorders mainly hyperhydricity, which usually are induced from high cytokinins concentrations (Magyar-Tábori et al. 2010).

Most of the calluses induced showed green coloration, compact texture and rapid growth. In addition, formation of organogenic nodules was observed in leaf segments grown in culture medium supplemented with 1.12 mg L⁻¹ BAP (Fig. 2b). The differentiation of organogenic nodules has been reported in several species with different types of explant (Ferreira et al. 2009; Moyo et al. 2009; Sahi et al. 2010; Rocha et al. 2012). However, for *G. americana*, this is the first report of the differentiation of these structures. The formation of organogenic nodules represents one of the fastest and most efficient systems for seedling regeneration parallel to somatic embryogenesis, presents advantages for both massive propagation and reduction of somaclonal variation, and provides numerous possibilities for use in breeding programs and genetic engineering (Fortes et al. 2010; Rocha et al. 2012).

PGRs play a key role in the induction process of organogenic nodules, particularly cytokinins, because the formation of nodular meristemoids is dependent on a gene encoding a cytokinin receptor for activation of the nodule initiator (Murray et al. 2007; Fortes et al. 2010). Thus, it can be stated that supplementation with 1.12 mg L⁻¹ BAP in leaf segments promoted an adequate hormonal balance, especially of cytokinins, resulting in the induction and differentiation of organogenic nodules.

The formation of calli with a friable structure from root segments grown in medium supplemented with 3.37 mg L⁻¹ BAP was observed. This result may provide a new way for the implementation of cell suspension techniques and manipulation of active biomolecules for this species, since the root provides an excellent source of explants and represents a promising approach to the production of active biomolecules, being able to synthesize and store a great diversity of secondary metabolites (Rocha et al. 2012; Simão et al. 2016). In addition to the present study, there is a single report by Yee et al. (2010) related to the use of *G. americana* root segments cultured *in vitro*. However, the formation of calli with a friable structure was not observed and the shoot induction from root segments required a high concentration of BAP (5 mg L⁻¹) compared to the results obtained here (1.12 mg L⁻¹). Finally, the development of adventitious shoots was observed in approximately 120 days of incubation, a rather long period compared to the time to obtain shoots in the present study (40 days).

The callus regeneration potential varied as a function of BAP concentration. Thus, the culture medium with the lowest BAP concentration (1.12 mg L⁻¹) provided a lower frequency of callus induction but a higher capacity for plant regeneration. In addition, the results showed that the ability to respond to induction treatment was different for the different explants. These differences may be associated with both the absorption and the metabolism of BAP, which may differ among tissues, resulting in the induction of different morphogenetic pathways (Perez-Jimenez et al. 2014; Cappelletti 2016), as well as natural variations in the endogenous levels of cytokinins and auxins in the different explants due to their proximity to or distance from the synthesis sites. For example, the leaf and root are active sites for the synthesis and accumulation of auxins, and therefore, to establish an adequate balance between these hormones and to promote the induction of budding in leaf and root segments, the application of BAP was necessary (Manoharan et al. 2016; Olatunji et al. 2017). On the other hand, in segments of hypocotyls, the hormonal balance is suitable for the induction of adventitious shoots.

The success of *in vitro* regeneration depends on both shoot multiplication and the production of plantlets with normal roots, which is essential for the establishment and survival of plantlets under field conditions. Normally, auxins are used for rooting induction (Mignoli et al. 2017). However, the best rooting response (95%) was obtained when the shoots were cultured in WPM medium in the absence of IBA. Additionally, the presence of IBA in the culture medium induced callus formation at the bases of the shoots, with a friable texture and without organogenic potential (Fig. 6a-d). Thus, the results suggest that the auxin levels present in the shoots were enough to induce rooting, and the addition of IBA might have increased the endogenous auxin levels in relation to those of other plant hormones, resulting in callus formation (Perez- Jimenez et al. 2014; Olatunji et al. 2017). Therefore, the results indicate that induction of rooting in shoots of *G. americana* dispenses the use of IBA. However, a study conducted by Rocha et al. (2008) verified a maximum of rooting (70%) when shoots were cultured in medium supplemented with 2 mg L⁻¹ IBA. The variation of responses may be related to shoot age since the shoots used in the present study originated from young tissues, which in turn are the most competent and sensitive to exogenous auxin application (Mikula et al. 2015; Prudente et al. 2017).

Existing information on the regeneration of *G. americana* plants from tissue culture mainly used explants of nodal segments, leaf segments. However, the efficiency of these protocols is reduced, considering that the estimated time to obtain plantlets is approximately eight months, with a maximum frequency of regeneration shoot of 37% and number of plants regenerated per explant of 2.1 (Almeida et al. 2015; Sá et al. 2016). Therefore, it was possible to establish an efficient protocol for the *in vitro* regeneration of *G. americana* that allows high regeneration rates of shoots (80%), providing an average of 5 regenerated plants per explant using hypocotyl segments with a low concentration of BAP (1.12 mg L⁻¹). In addition, the time required to obtain seedlings was short (130 days), which represents approximately half of the time observed in previous reports (Rocha et al., 2008; Almeida et al., 2015; Sá et al.,

2016). Additionally, plantlets showed a high capacity for transference to the *ex vitro* environment, presenting 90% survival at the end of 30 days of acclimatization.

Usually, the culture of woody plants using tissue culture tools is difficult when compared to that of herbaceous plants (Asakura et al. 2017). However, the results indicate that this species has excellent characteristics for tissue culture, due to the higher frequency of callus induction and plant regeneration potential from different explant sources. Finally, the time needed for plant production is approximately 130 days, which is fast, considering that it is a woody plant.

Conclusions

The morphogenetic pattern and the *in vitro* regeneration capacity of *G. americana* show differences based on the explant source used and the BAP concentration added to the culture medium. The use of different sources of explants (hypocotyl, root and leaf) allows the establishment of an efficient system for *in vitro* regeneration. MS medium supplemented with 1.12 mg.L^{-1} BAP proved to be optimum for adventitious shoots induction in segments hypocotyl, root and leaf. In addition rooting phase induction of shoots dispenses the use of growth regulators. This system could represent an important method for rapid, large-scale cloning of *G. americana* and may provide support for further research and exploration of its active biomolecules.

Author contribution statement RRS, PDOP and RP conceived and designed the experiment. RRS, RRS, MVR and DPCS performed the experiments, and analyzed and interpreted the data. RRS and PDOP wrote the manuscript. All authors, read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements The authors are thankful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for Supporting Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for granting scholarships.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Almeida CS, Silva AVC, Araújo AG, Léo AS. (2015). Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. *Revista Caatinga* 28:58-64. <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/3069>
- Alves JSF, Medeiros LA, Fernandes-Pedrosa MF, Araújo RM, Zucolotto SM (2017) Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27:641-644. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.03.006>
- Asakura I, Hoshino Y (2017) Evaluation of plant regeneration ability of different explants and establishment of an efficient regeneration system using immature seeds in *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. *Scientia Horticulturae* 220:275–282. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.012>
- Bhuvaneshwari K, Gokulanathan A, Jayanthi M, Govindasamy V, Milella L, Lee S, Yang DC, Girija S (2016) Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites? *Food Chemistry*:194, 55–60. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.07.136](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.136)

- Brauch JE, Zapata-Porras SP, Buchweitz M, Aschoff JK, Carle R (2016) Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? *Food Research International* 89:391–398. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.029>
- Cappelletti R, Sabbadini S, Mezzetti B (2016) The use of TDZ for the efficient in vitro regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars, *Scientia Horticulturae* 207:117–124. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.016>
- FAO (2017) The future of food and agriculture: Trend and challenges. Rome. <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/a-i6583e.pdf>
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38:109–112. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-7054201400020000>
- Ferreira S, Batista D, Serrazina S, Pais MS (2009) Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96:35–43. doi:10.1007/s11240-008-9457-y
- Fortes AM, Santos F, Pais MS (2010) Review Article: Organogenic Nodule Formation in Hop: A Tool to Study Morphogenesis in Plants with Biotechnological and Medicinal Applications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:1-16. doi: 0.1155/2010/583691
- Joint FAO, WHO (2017) Evaluation of certain food additives. Eighty-fourth report of the joint. Expert committee on food additives. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259483/1/9789241210164-eng.pdf>

- Lee JM, Pijut PM (2017) Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinus nigra*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 130: 335-343. doi: 10.1007/s11240-017-1228-1
- Lloyd G, Mc Cown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture Combined Proceedings. *Int. Plant Propagators' Soc* 30:421–427.
- Magistrali PR, José AC, Faria JMR, Gasparin E (2013) Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. *Journal of Seed Science* 35:495-500. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372013000400011
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Silva JAT, Bulley SM, Hudák I (2010) the role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101:251-267. doi: 10.1007/s11240-010-9696-6
- Manoharan R, Tripathi JM, Tripathi L (2016) Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 126:481–497. doi: 10.1007/s11240-016-1017-2
- Mignolli F, Mariotti L, Picciarelli P, Vidoz ML (2017) Differential auxin transport and accumulation in the stem base lead to profuse adventitious root primordia formation in the aerial roots (*aer*) mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Physiology* 213:55–65. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.02.010
- Mikuła A, Pozoga M, Grzyb M, Rybczyn JJ (2015) An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb.: the importance of explant type, and physical and chemical factors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 123:467–478. doi:10.1007/s11240-015-0850-z
- Ministério do meio ambiente MMA (2016) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual e potencial: Plantas para o futuro-Região Centro-Oeste. Brasília-DF. [https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1073295/especies-nativas-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1073295/especies-nativas)

da-flora-brasileira-de-valor-economico-atual-ou-potencial-plantas-para-o-futuro-regiao-centro-oeste

- Moyo M, Jeffrey FF, Staden JV (2009) In vitro morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98:273–280. doi:10.1007/s11240-009-9559-1
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473–497. doi: 0.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315:101-104. doi: 10.1126/science.1132514
- Neri-Numa IA, Pessoa MG, Paulino BN, Pastore GM (2017) Review: Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science & Technology* 67:271-279. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.018>
- Olatunji D, Geelen D, Verstraeten I (2017) Review: Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *International Journal of Molecular Science* 18:1-29. doi:10.3390/ijms18122587
- Perez-Jimenez M, Cantero-Navarro E, Perez-Alfocea F, Cos-Terrer J (2014) Endogenous hormones response to cytokinins with regard to organogenesis in explants of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and rootstocks (*P. pérsica* x *Prunus dulcis*). *Plant Physiology and Biochemistry* 84:197-202. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.014>
- Prudente DO, Paiva R, Carpentier S, Swennen R, Nery FC, Silva LC, Panis B (2017) Characterization of the formation of somatic embryos from mature zygotic embryos of *Passiflora ligularis* Juss. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 131:97-105. doi: 10.1007/s11240-017-1266-8

- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111:69–78. doi: 10.1007/s11240-012-0171-4
- Rocha MAC, Costa MAPC, Silva AS, Ledo CAS, Moreira MJS, Bastos LP (2008) Enraizamento *in vitro* a aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana*)¹. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:769-774. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000300035>
- Sá FP, Ledo AS, Amorim JAE, Silva AVC, Pasqual M (2016) *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. *Ciência e Agrotecnologia* 40:155-163. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542016402036015>
- Sahai A, Shahzad A, Sharma S (2010) Histology of organogenesis and somatic embryogenesis in excised root cultures of an endangered species *Tylophora indica* (Asclepiadaceae). *Australian Journal Botanic* 58:198–205. doi:10.1071/BT09220
- Santana KB, Almeida AF, Souza VL, Mangabeira PAO, Silva DC, Gomes FP, Dutruch L, Loguercio LL (2012) Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. *Environmental and Experimental Botany* 80:35–42. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.02.004
- Santhoshkumar J, Rajeshkumar S, Kumar SV (2017) Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 11:46–57. doi: [tophttp://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.06.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.06.004)
- Silva DPC, Paiva R, Herrera RC, Silva LC, Ferreira GN, Reis MV (2018) Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 133:115-122. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1366-5>

- Simão MJ, Fonseca E, Mansur E, Pacheco G (2016) Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. And their ability to produce antioxidant compounds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 124:419-430. doi:10.1007/s11240-015-0904-2
- Souza RR, Paiva PDO, Silva RR, Reis MV, Nery FC, Paiva R (2016) Optimizing of the *in vitro* jenipapo seeds germination process. *Ciência e Agrotecnologia* 40:155-163. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542016406014816>
- Vasconcelos AL, Santos AV, Padilha RJR, Alves LC, Randau KP (2017) Anatomical characterization of ultra-structures, biominerals and histolocalization of metabolites in leaves of *Genipa americana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27:541–548. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.002>
- Yee TF, Goh CI, Rao AN (2010) *In vitro* studies on *Genipa americana*. *Journal Tropical Medicinal Plants* 11:71-88. <http://connection.ebscohost.com/c/articles/59601409/vitro-studies-genipa-americana>

Figures

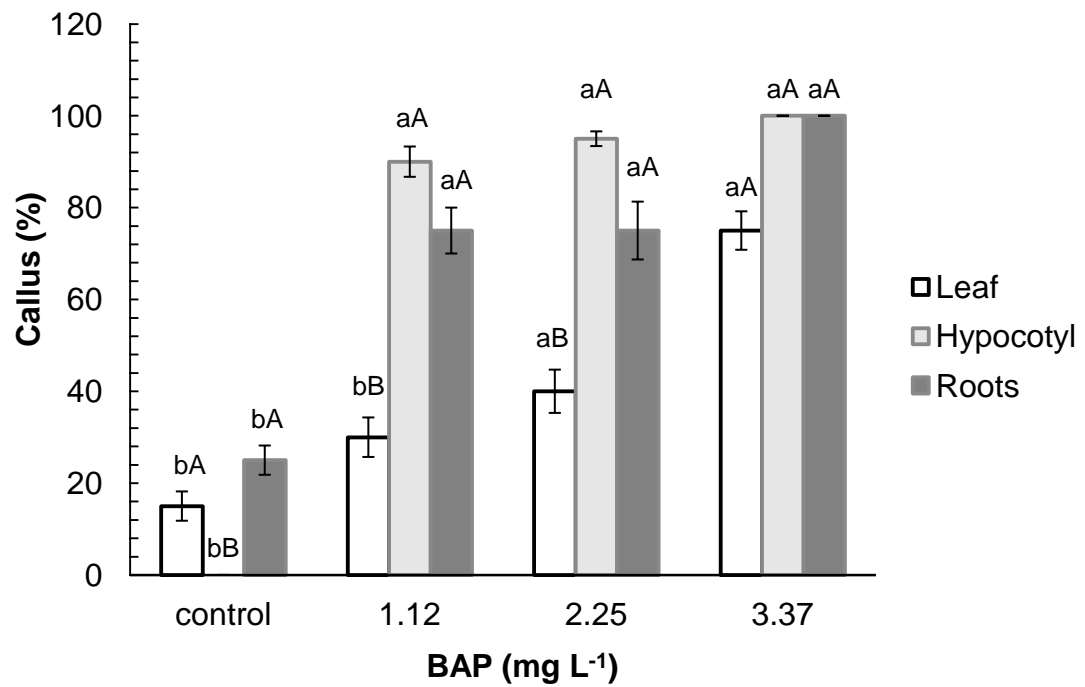


Fig. 1 Callus formation in different *G. americana* explants at varying BAP concentrations. Averages followed by the same letter do not differ among themselves by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). The capital letters compare the different explants, and the lowercase letters compare the BAP concentrations. *Vertical bars* indicate standard error of the median

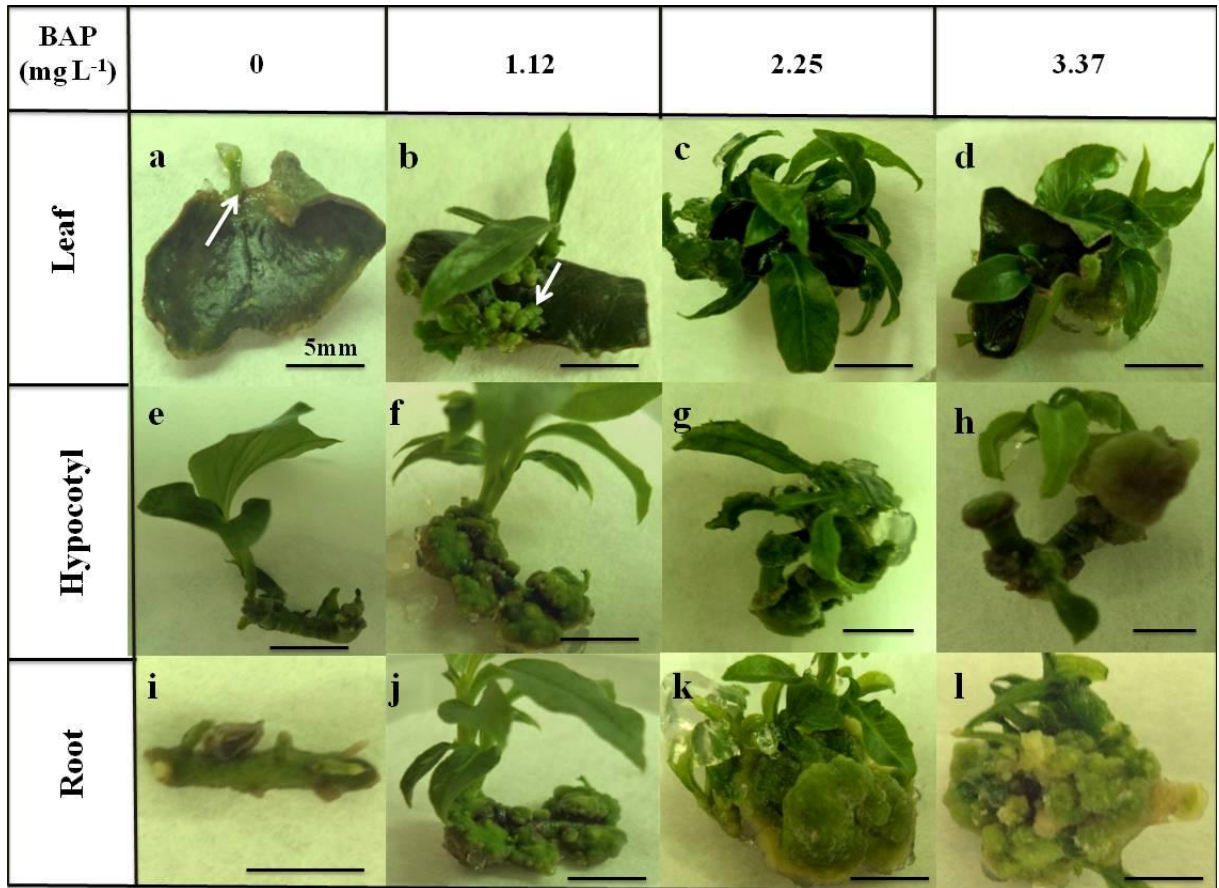


Fig. 2 Morphogen gradients in different explants (leaf, hypocotyl and root) of *G. americana*. The photographs were taken 20 days after explant inoculation in culture medium supplemented with BAP

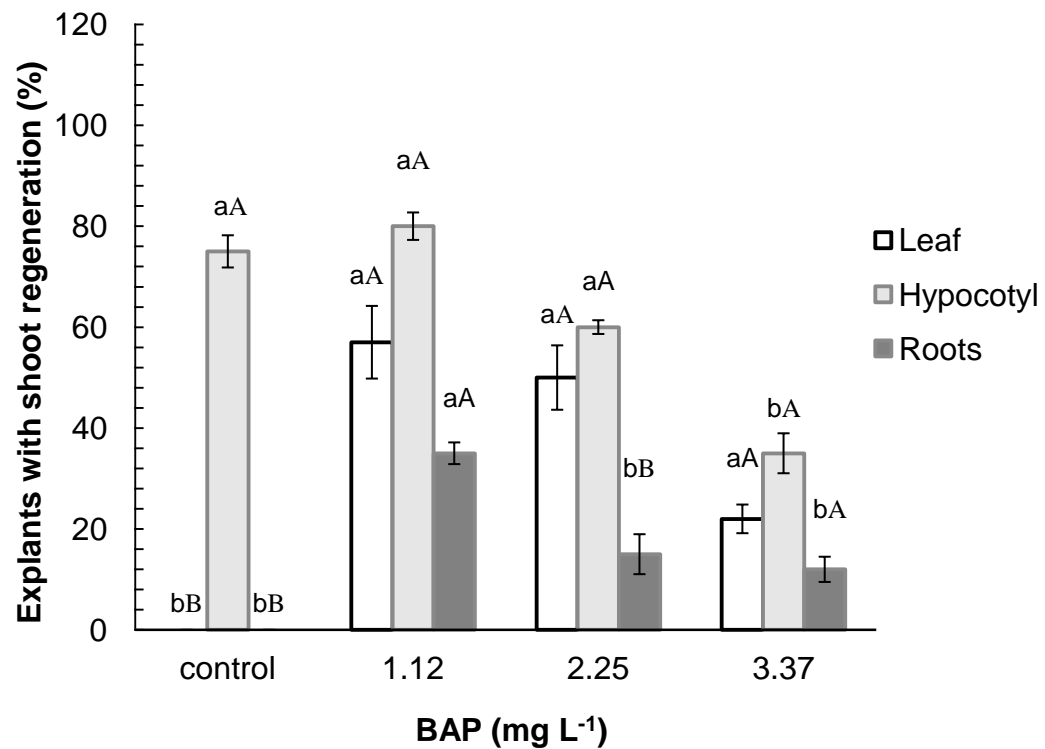


Fig. 3 Frequency of shoot regeneration in different *G. americana* explants by BAP concentration. Averages followed by the same letter do not differ among themselves by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). The capital letters compare the different explants, and the lowercase letters compare the BAP concentrations. *Vertical bars* indicate standard error of the median

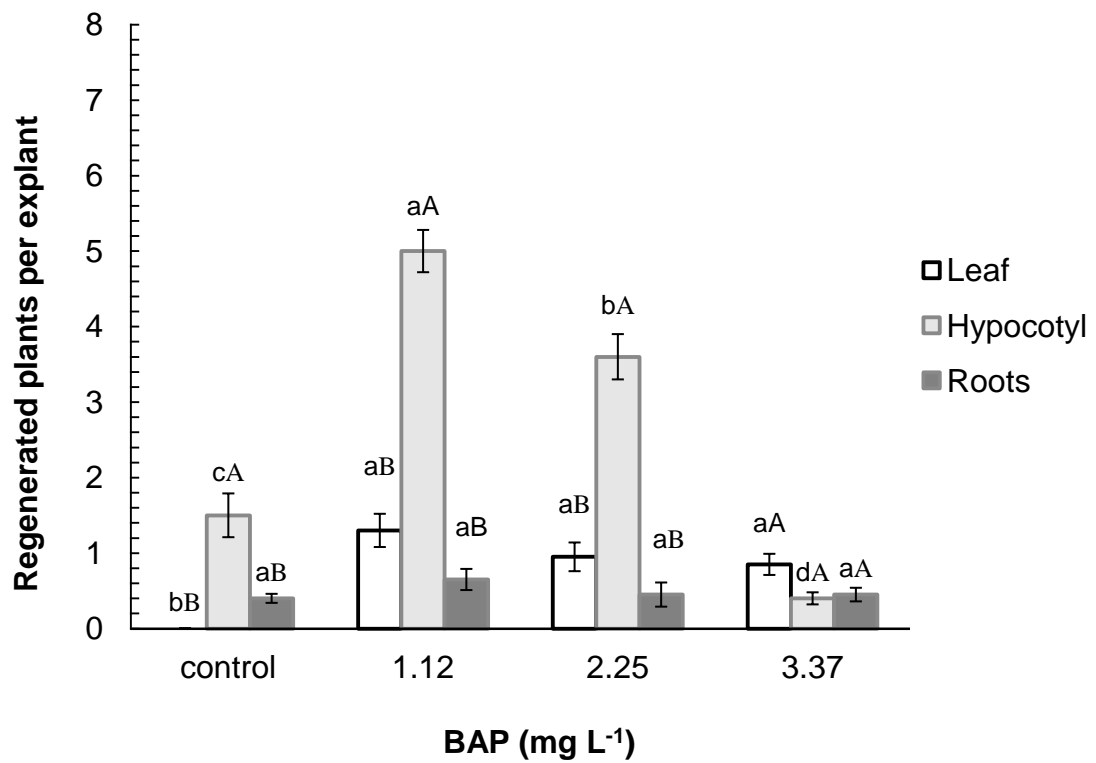


Fig. 4 Number of plants regenerated per *G. americana* explant by BAP concentration. Averages followed by the same letter do not differ among themselves by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). The capital letters compare the different explants, and the lowercase letters compare the BAP concentrations. *Vertical bars* indicate standard error of the median

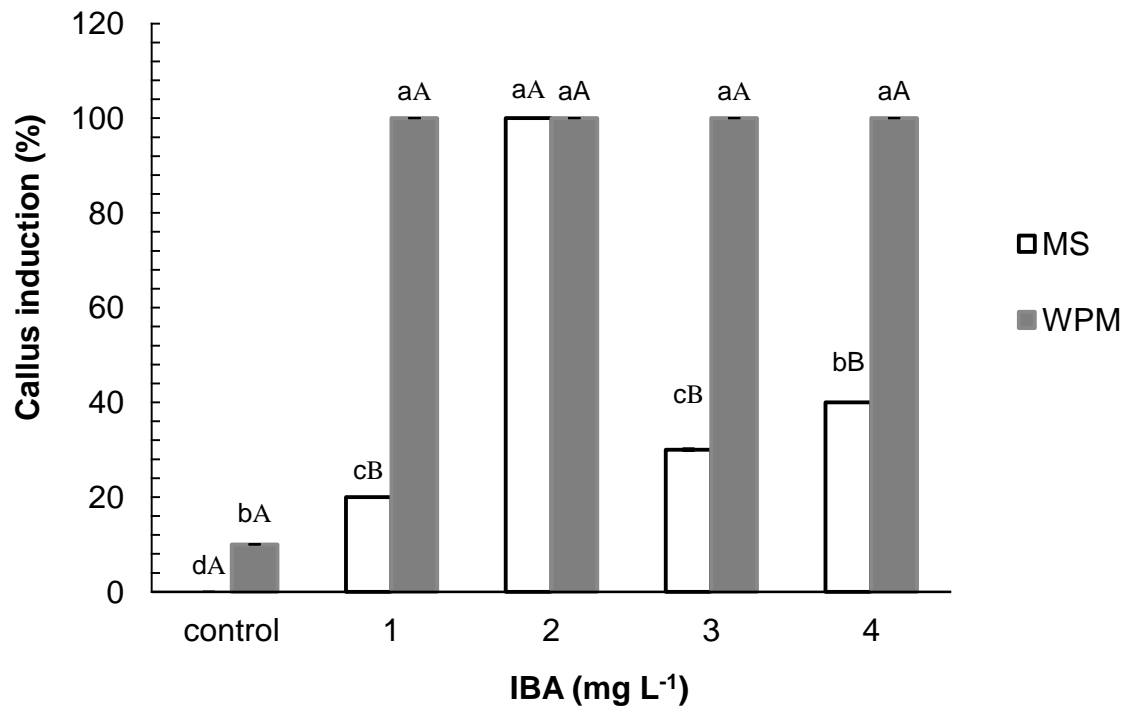


Fig. 5 Callus induction in *G. americana* shoots grown in MS and WPM media supplemented with IBA. Averages followed by the same letter do not differ among themselves by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). The capital letters compare the different explants, and the lowercase letters compare the IBA concentrations. *Vertical bars* indicate standard error of the median

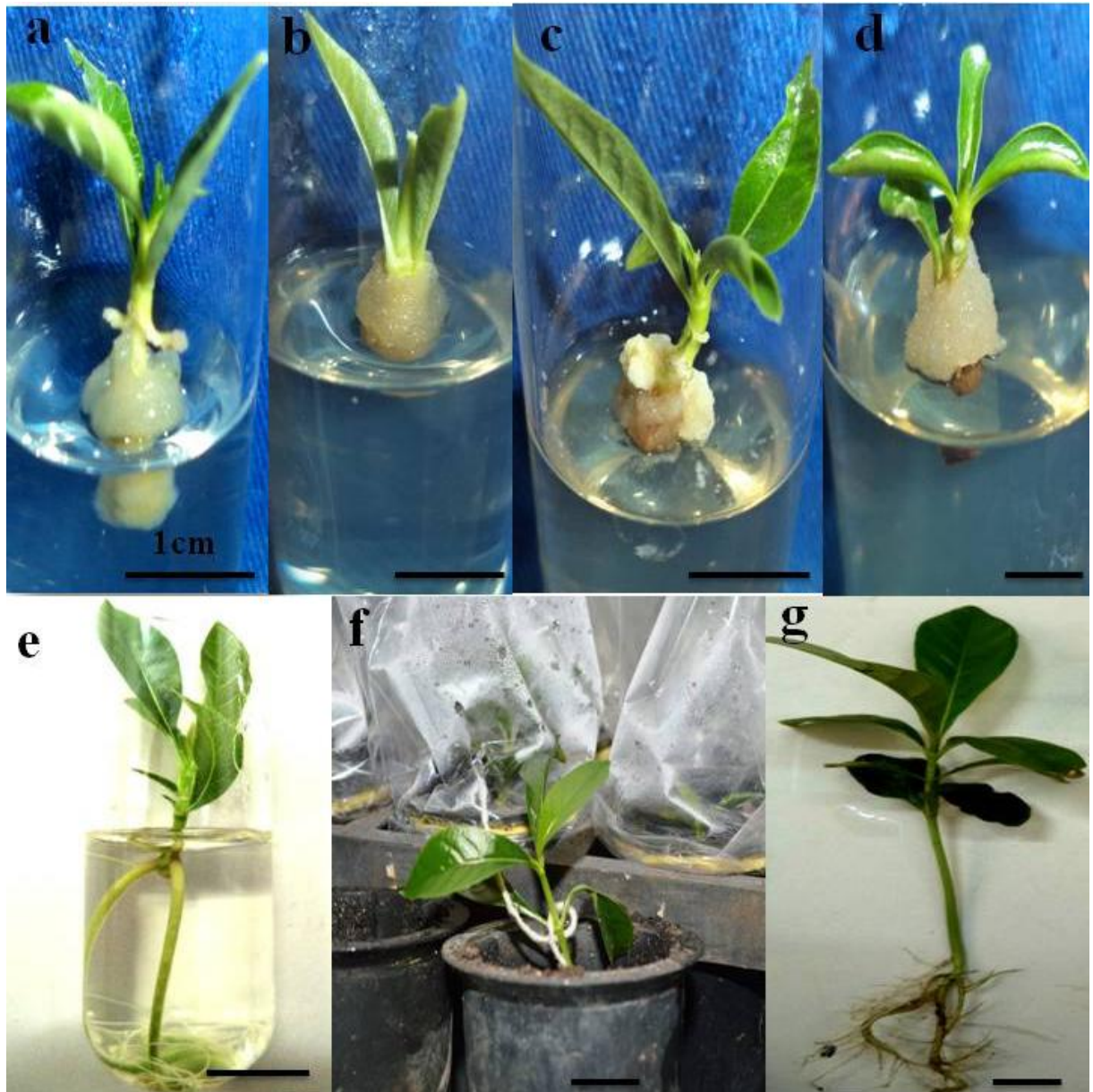


Fig. 6 Appearance of calluses developed at the base of *G. americana* shoots grown in WPM and MS medium supplemented with IBA at the following concentrations: 1.0 (a); 2.0 (b); 3.0 (c), and 4.0 mg L⁻¹ (d). *In vitro* *G. americana* shoots rooted after 45 days in WPM medium without IBA (e). Micropropagated plantlets 10 days after transfer to *ex vitro* conditions (f). Micropropagated plant after acclimatization, showing normal growth aspect (g). Bars 1 cm

ARTIGO 2- Alterações morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes durante a aclimatização de *Genipa americana*

Artigo formatado segundo normas do periódico: In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant

**Alterações morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes durante a
aclimatização de *Genipa americana***

Rafaela Ribeiro de Souza¹, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva², Afonso Ricardo de Souza¹
Raphael Reis da Silva¹, Diogo Pedrosa Corrêa da Silva², Michele Valquíria dos Reis¹, Renato
Paiva¹

1 Federal University of Lavras, Department of Biology, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brazil. * Corresponding author: rfag.fisio@gmail.com

2 Federal University of Lavras, Department of Agriculture, Lavras-MG, Brazil.

Resumo: O sucesso final da micropropagação e a viabilidade comercial desta técnica não dependem apenas do número de plântulas regeneradas, mas da capacidade de transferência para o ambiente *ex vitro* em grande escala, com alta taxa de sobrevivência. Neste contexto, objetivou-se o estabelecimento *ex vitro* e a avaliação de alterações morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes durante a aclimatização de plântulas micropropagadas de *Genipa americana* L. Plântulas enraizadas *in vitro* foram transferidas para tubetes preenchidos com substrato à base de turfa e vermiculita e foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 14 dias de aclimação em sala de crescimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com 70% de sombreamento. Aos 0 (correspondente a fase *in vitro*), 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para condições *ex vitro*, foram realizadas análises anatômicas de crescimento e atividade de enzimas antioxidantes. Ao final de 30 dias de aclimatização observou-se 90% de sobrevivência das mudas. Os resultados refletem alta plasticidade fenotípica dessa espécie e as alterações morfoanatômicas e fisiológicas como emissão de novas folhas, aumento no conteúdo de clorofilas, aquisição de formato elíptico dos estômatos, sobrevivência de raízes formadas *in vitro* e a atividade estimulada de enzimas antioxidantes

garantiram a continuidade do crescimento e aclimatação das plantas, assegurando a continuidade do crescimento e alta taxa de sobrevivência (90%) após aclimatização.

Palavras-chave: jenipapeiro, anatomia, estabelecimento *ex vitro*, plasticidade fenotípica.

Introdução

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie de alto potencial econômico devido às inúmeras possibilidades de usos em projetos paisagísticos e em indústrias alimentícias, farmacêuticas, nanotecnológicas e madeireiras. Pertence à família Rubiaceae, e é amplamente distribuída no Cerrado brasileiro (Santana et al. 2012; Souza et al. 2016; Campelo et al. 2017; Santhoskumar et al. 2017; Souza et al. 2018). Normalmente *G. americana* é propagado por sementes, no entanto, além de o processo germinativo ser desuniforme o número de mudas produzidas é limitado (Sá et al. 2016; Souza et al. 2016).

O cultivo *in vitro* é uma alternativa para propagação de *Genipa americana* que possibilita tanto superar as dificuldades impostas pelo seu tradicional sistema de propagação, como a multiplicação rápida e massiva de mudas em menor tempo e em qualquer época do ano (Sá et al. 2016; Souza et al. 2018). No entanto, o sucesso final da propagação e a viabilidade comercial desta técnica não dependem apenas do número de plântulas regeneradas, mas da capacidade de transferência para o ambiente *ex vitro* (Ahmed e Anis 2014; Sik-Shin et al. 2014).

As condições especializadas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais é caracterizado pelo uso de recipientes assépticos sob condições heterotróficas, com fornecimento de açúcares, nutrientes e reguladores de crescimento, além de alta umidade relativa do ar e baixos níveis de irradiação e concentração de CO₂ (Faisal e Anis 2009; Martins et al. 2015; Gonçalves et al. 2017). Como consequência as plântulas regeneradas podem exibir alterações significativas na

estrutura e funcionamento dos tecidos como estômatos não funcionais, camada de cera cuticular mínima ou inexistente e conexão vascular incompleta (Decchetti et al. 2008; Rodrigues et al. 2015; Lando et al. 2016). Dessa forma, a aclimatização constitui uma das etapas mais críticas da micropropagação, pois nessa fase as plantas devem apresentar a capacidade de se reajustar para um estado autotrófico e corrigir anormalidades ocasionadas pelo cultivo *in vitro* assegurando sua adaptação e estabelecimento em condições *ex vitro* (Martins et al. 2015; Asayesh et al. 2017).

Normalmente as plantas cultivadas *in vitro* apresentam baixa capacidade fotossintética e mecanismos ineficientes de controle de perda de água o que as tornam mais vulneráveis ao choque de transplante para condições *ex vitro* (Sik-Shin et al. 2014). Conseqüentemente são mais susceptíveis ao estresse hídrico e fotoinibição, sendo as principais causas de mortalidade das plantas micropropagadas durante a aclimatização (Chaari-Rkhis et al. 2015). Essas tensões levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo. Porém, as células possuem um mecanismo de defesa antioxidante constituído por enzimas e compostos orgânicos que possuem a capacidade de neutralizar e minimizar os danos potenciais causados por EROs (Gonçalves et al. 2017).

O sucesso no processo de aclimatização depende tanto da capacidade do reajuste fisiológico das plantas a fim de contornar os desequilíbrios causados pela sua transferência para o ambiente *ex vitro*, como de sofrerem alterações morfoanatômicas durante os primeiros dias de aclimatização, assegurando sua adaptação e sobrevivência (Lima-Brito et al. 2016; Lando et al. 2016; Kondamudi et al. 2017). No entanto, as informações disponíveis referentes às alterações morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes que ocorrem durante o processo de aclimatização de plantas micropropagadas são poucas (Osório et al. 2013; Sik-Shin et al. 2014; Lando et al. 2016; Gonçalves et al. 2017) e inexistente para *G. americana*. Neste contexto, objetivou-se o estabelecimento *ex vitro* e a avaliação de alterações

morfoanatômicas e atividade de enzimas antioxidantes durante a aclimatização de plântulas micropropagadas de *Genipa americana* L.

Material e métodos

Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *Genipa americana* foram germinadas *in vitro* seguindo protocolo descrito por Souza et al. (2016). Para indução de brotações, segmentos do hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo constituído de sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) + 3% de sacarose + 0.7% de ágar e suplementado com 1.12 mg L^{-1} de BAP. Após 45 dias de cultivo, brotações adventícias foram induzidas ao enraizamento em meio WPM (Lloyd e McCown 1980) + 3% de sacarose + 0,25 % de phytigel, na ausência de reguladores de crescimento (Souza et al., 2018).

Aclimatização

Aos 60 dias após a indução de enraizamento *in vitro*, as plântulas enraizadas (Fig 1a) foram retiradas dos tubos de ensaio e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram transferidas para tubetes de 250 mL contendo substrato comercial a base de turfa e vermiculita e permaneceram cobertos com envoltório plástico nos primeiros 15 dias (Fig 1b). As plântulas foram irrigadas uma vez por semana com 10 mL de solução nutritiva composta de metade da concentração de macro e micronutrientes de Murashige-Skoog (MS) e foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após 14 dias de aclimatação em sala de crescimento, as plantas foram transferidas para uma casa de vegetação aberta sem condicionamento ambiental (Fig 1c), com sombreamento de 70% onde

permaneceram durante 16 dias. A irradiância variou em uma faixa de 340-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a umidade relativa de 60 a 80%. Aos 30 dias de aclimatização avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das mudas.



Fig 1. Plântulas de *Genipa americana* enraizadas *in vitro* (a) durante a aclimatização cobertas com envoltório plástico (b) aos 21 dias após a transferência *ex vitro* (c) e aos 30 dias de aclimatização (d).

Crescimento e índice de clorofila

Foram selecionadas 20 plantas ao acaso, essas plantas foram marcadas e analisadas no estágio *in vitro* (correspondente ao dia 0 de aclimatização) e aos 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para condições *ex vitro*. O índice de clorofila foi medido com auxílio de um clorofilômetro portátil (Chlorophyll Meter, SPAD-501, da Minolta Co. Japão) em dois pares de folhas totalmente expandidas no terço médio das plantas, no período da manhã. Enquanto a

caracterização do crescimento foi realizada por meio da contagem direta do número de folhas, e pela medição dos comprimentos da parte aérea e raiz com auxílio de régua graduada.

Atividade de enzimas antioxidantes

Para quantificação das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dismutase do superóxido (SOD) foi selecionada ao acaso três plântulas de jenipapeiro durante o período de 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para condições *ex vitro*. Para a obtenção do extrato, 200 mg do material vegetal foi macerado com nitrogênio líquido e antioxidante PVPP. O meio de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e água destilada. Em cada ependorf foi acrescentado 1500 µL do meio de extração. O extrato foi centrifugado a 13000g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado para a quantificação das enzimas.

A atividade da SOD foi avaliada conforme metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977) com modificações, onde 10 µL do sobrenadante foi pipetado em placa de Elisa juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, riboflavina 2 µM e água destilada. Em seguida, a placa foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 560 nm.

Para quantificação da atividade da CAT foi utilizado o método proposto por Mengutay et al. (2013), em que alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,6, acrescido de Na₂EDTA 0,1 mM, dissolvido no tampão, e peróxido de hidrogênio 10 mM. O meio de incubação foi incubado

em banho-maria a 30°C antes da quantificação da atividade enzimática. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por três minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM⁻¹cm⁻¹.

A atividade da APX foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981) com modificações, na qual 7 µL do sobrenadante foi pipetado em placa de Elisa juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM, peróxido de hidrogênio 0,1 mM e água destilada. A atividade da APX foi determinada pela taxa de oxidação do ascorbato, a cada 15 segundos, durante 3 minutos, através da leitura da absorbância a 290 nm.

Análises histológicas

Para caracterização morfoanatômica, o 2º par de folhas completamente expandidas da porção mediana, e raízes foram coletados ao acaso durante os períodos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para condições *ex vitro* e foram fixadas em álcool etílico 70% (v/v). Foi utilizado o terço médio das lâminas foliares, em seções transversais e paradérmicas; e seções transversais de raízes adventícias distante 2 cm da base. Os cortes foram efetuados à mão livre e, em seguida, procedeu-se a clarificação em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de 3 a 5 minutos. A coloração dos cortes transversais foi realizada utilizando-se uma mistura de azul de astra 0,1% e safranina 1% na proporção 7:3. Para os cortes paradérmicos, a coloração foi realizada com safranina a 0,1%. Posteriormente, foram preparadas lâminas semipermanentes em água glicerinada (1:1), lutadas com esmalte sintético (Sridharan e Shankar 2012). As lâminas foram observadas em

microscópio óptico Zeiss, com auxílio de câmara clara e câmara digital acoplada da marca Canon.

Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste “F” ($P < 0,05$) as médias dos tratamentos para análise da atividade de enzimas antioxidantes foram comparadas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$), enquanto que as médias obtidas em análises de características de crescimento e índice de clorofila foram submetidas à análise de regressão ($P > 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software SISVAR (Ferreira 2014).

Resultados e Discussão

As mudas micropropagadas de *G. americana* apresentaram 90% de sobrevivência ao final de 30 dias de aclimatização. Houve um incremento significativo no crescimento das plantas após a transferência para condições *ex vitro*, resultando aos 28 dias de aclimatização em um aumento de cerca de 51,7, 216 e 44,1% respectivamente para altura de plantas, número de folhas e comprimento de raiz (Fig 1a-c). Além disso, houve aumento no índice de clorofila apresentando valor máximo estimado de aproximadamente 57,7 mg cm⁻² aos 18 dias após a transferência para condições *ex vitro* (Fig 1d).

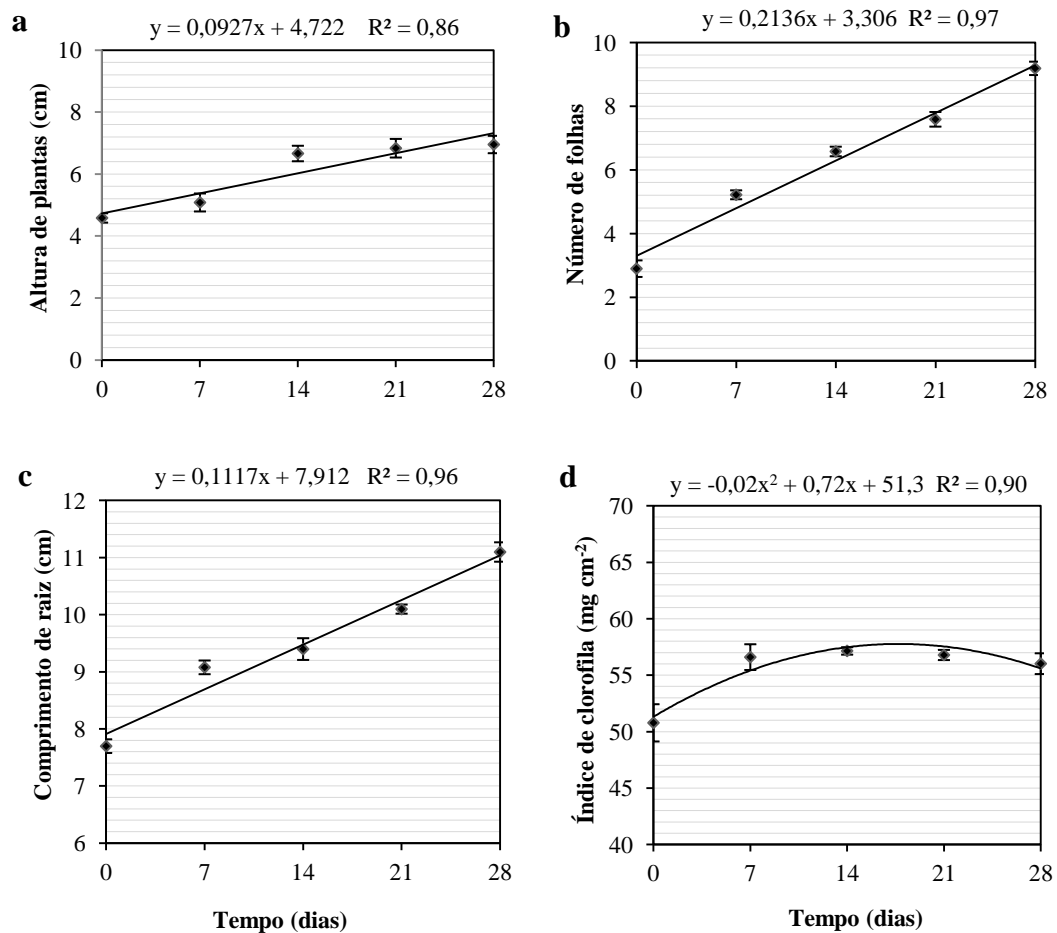


Fig 1. Altura de plantas (a), número de folhas (b), comprimento da raiz (c) e índice de clorofilas (d) de mudas micropropagadas de *G. americana* em função do tempo após a transferência para condições *ex vitro*. Desvios padrão são mostrados por barras de erro verticais.

Normalmente estudos de aclimatização usam a taxa de sobrevivência como principal medida de estabelecimento *ex vitro* bem sucedida. No entanto, a lenta taxa de crescimento é tão prejudicial quanto à taxa de sobrevivência (Mohamed 2008; Martins et al. 2015). Portanto, no presente estudo notou-se que o crescimento das plântulas foi gradual e constante durante todo o período de aclimatização, e o número de folhas teve um aumento bastante expressivo (216%) em relação aos comprimentos da parte aérea e raiz. O que indica que a priorização na emissão de novas folhas pode ser estratégica permitindo aumento na resistência e adaptação das plantas micropropagadas ao ambiente *ex vitro*. Visto que a emissão de novas folhas

contribui diretamente para o aumento da área fotossintética disponível para absorção de luz e produção de biomassa (Souza et al. 2016).

Com relação ao conteúdo de clorofilas, sabe-se que o aumento ou a diminuição depende da plasticidade da espécie. Essas flutuações permitem a obtenção do máximo de eficiência fotossintética em diferentes condições ambientais. Dessa forma, tanto o aumento do conteúdo de clorofilas como a emissão de novas folhas durante o processo de aclimatização para o ambiente *ex vitro* podem ter contribuído para o aumento da eficiência fotossintética garantindo a continuidade do crescimento das plantas (Martins et al. 2015; Souza et al. 2016; Gonçalves et al. 2017).

Com relação à atividade das enzimas antioxidantes nas folhas de mudas de *G. amrricana*, observou-se que a atividade da SOD foi bastante expressiva até 7 dias após a transferência para condições *ex vitro*, havendo uma redução aos 14 dias (Fig 2). Nas rotas enzimáticas de eliminação de EROs, a SOD representa a primeira linha de defesa no processo de desintoxicação, catalisando a dismutação de O_2^- a H_2O e O_2 . Nota-se que a atividade expressiva dessa enzima até os 7 dias após a transferência para condições *ex vitro* pode ter sido relevante para aclimatização bem sucedida de plantas de *G. americana*, visto que um aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante é decisivo para a aclimatização de plantas micropropagadas, pois influencia diretamente o desempenho e a sobrevivência das mesmas mantendo o equilíbrio entre formação e eliminação das EROs (Ahmed e Anis 2014; Gonçalves et al. 2017).

Mudanças significativas na atividade da SOD até os 7 dias após a transferência para condições *ex vitro* seguido de uma redução também foram relatadas por Ahmed e Anis (2014) em plântulas micropropagadas de *Cassia alata* L. Esse resultados reforçam que a redução na atividade de enzimas antioxidantes pode ser utilizada como sinal de aclimatação (Kondamudi

et al. 2017) e que o desenvolvimento de um sistema funcional de defesa antioxidante durante a aclimatização é fundamental para um estabelecimento *ex vitro* bem sucedido.

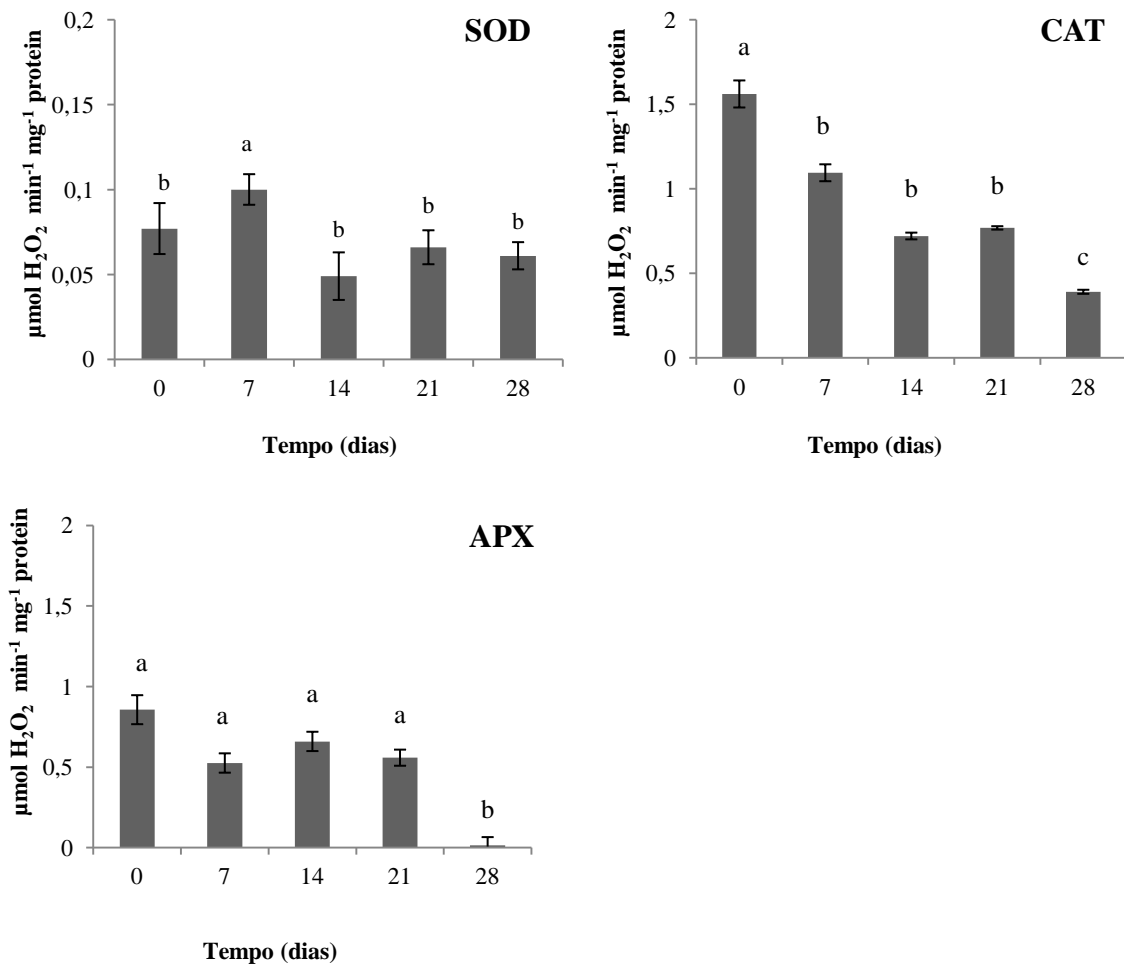


Fig 2. Atividade da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) em folhas de mudas micropropagadas de *G. americana* em função do tempo após a transferência para condições *ex vitro*. Desvios padrão são mostrados por barras de erro verticais.

Sob condições *in vitro* a atividade da CAT foi superior, enquanto a APX apresentou redução significativa aos 28 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* (Fig 2). Sabe-se que essas duas enzimas (CAT e APX) atuam na neutralização do H₂O₂ e o fato de suas atividades terem sido mais expressivas sob condições *in vitro*, pode estar relacionada a

geração de H_2O_2 como molécula sinalizadora em respostas morfogênicas (Kondamudi et al. 2017). Pois, embora ainda não seja bem compreendido, há evidências de que a produção de H_2O_2 apresenta uma ligação com a fisiologia do desenvolvimento principalmente durante a rizogênese (fase anterior a aclimatização) (Konieczny et al. 2014), visto que durante a indução de enraizamento em explantes cultivados *in vitro* na presença ou não de reguladores de crescimento há um expressivo aumento da formação de H_2O_2 acompanhado pelo aumento dessas enzimas (Ivanchenko et al. 2013).

Quanto à anatomia de folhas de *G. americana* foram observadas diferenças entre os tecidos ao longo do processo de aclimatização. No geral as folhas apresentaram estômatos restritos à face abaxial (Fig 3a-b) e epiderme uniestratificada em ambas às faces (Fig 4a-b), sendo classificadas como hipoestomática com estômatos do tipo anomocítico. Na condição *in vitro* (0 dias) os estômatos exibiram formato esférico (Fig 3b-seta), adquirindo ao longo da aclimatização forma elíptica (Fig 3b-f).

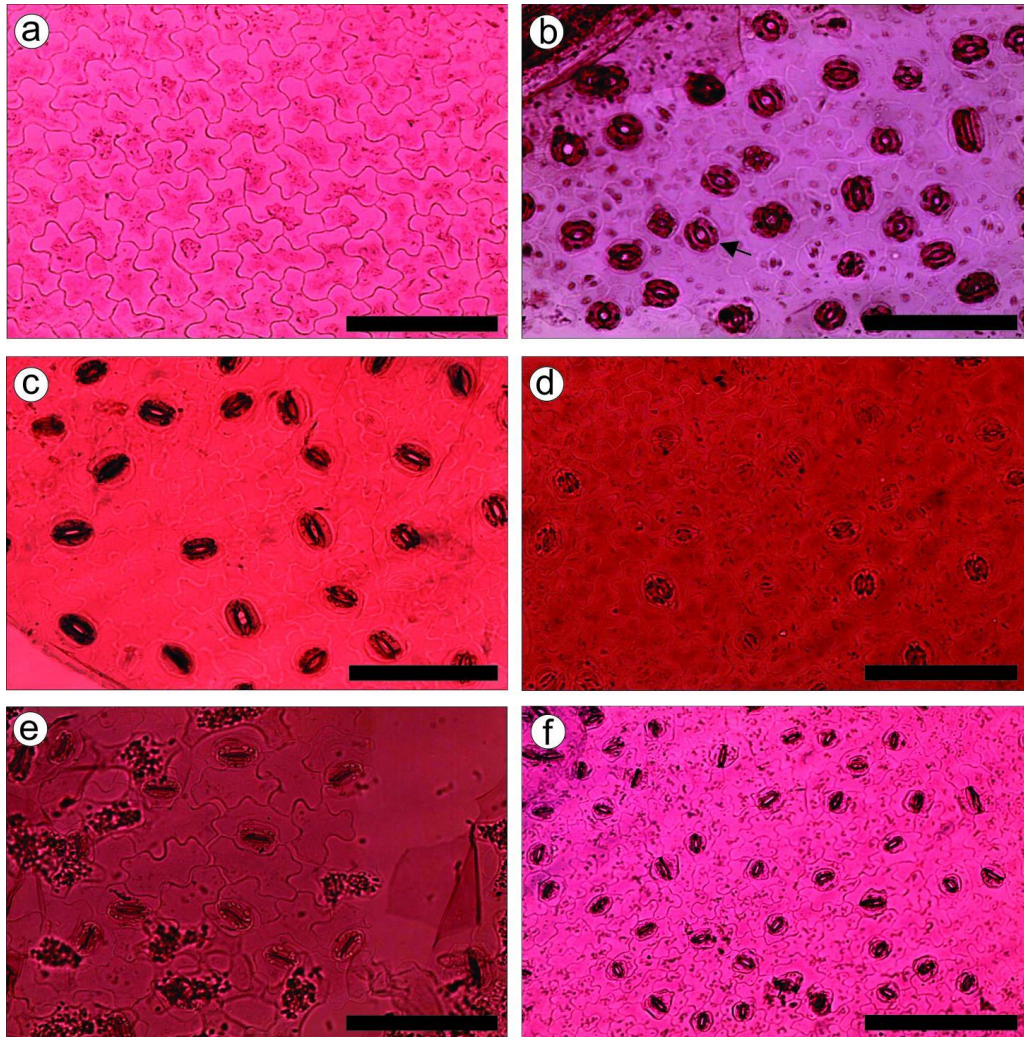


Fig 3. Seções paradérmicas da epiderme na superfície adaxial (a) e abaxial das folhas de *G. americana* sob condições *in vitro* (b); seção paradérmica da epiderme na superfície abaxial aos 7 dias (c); 14 dias (d); 21 dias (e) e 28 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* (f). Seta = estômatos abertos. Barras= 10 μ m.

O mesofilo e o sistema vascular das folhas em condições *in vitro* apresentaram-se menos diferenciado (Fig 4a-b), e, ao longo da aclimatização observaram-se maior diferenciação e organização desses tecidos. Observou-se ainda que sob condições *in vitro* as folhas apresentavam epiderme e cutícula pouco espessa (Fig 4b). Aos 14 dias após a transferência para condições *ex vitro* já foi possível verificar modificações (Fig 4c-d) que resultaram ao final da aclimatização em: maior espessamento da epiderme, com células da

epiderme adaxial apresentando convexidade acentuada e presença de espaços entre as células no parênquima lacunar (Fig 4e-f).

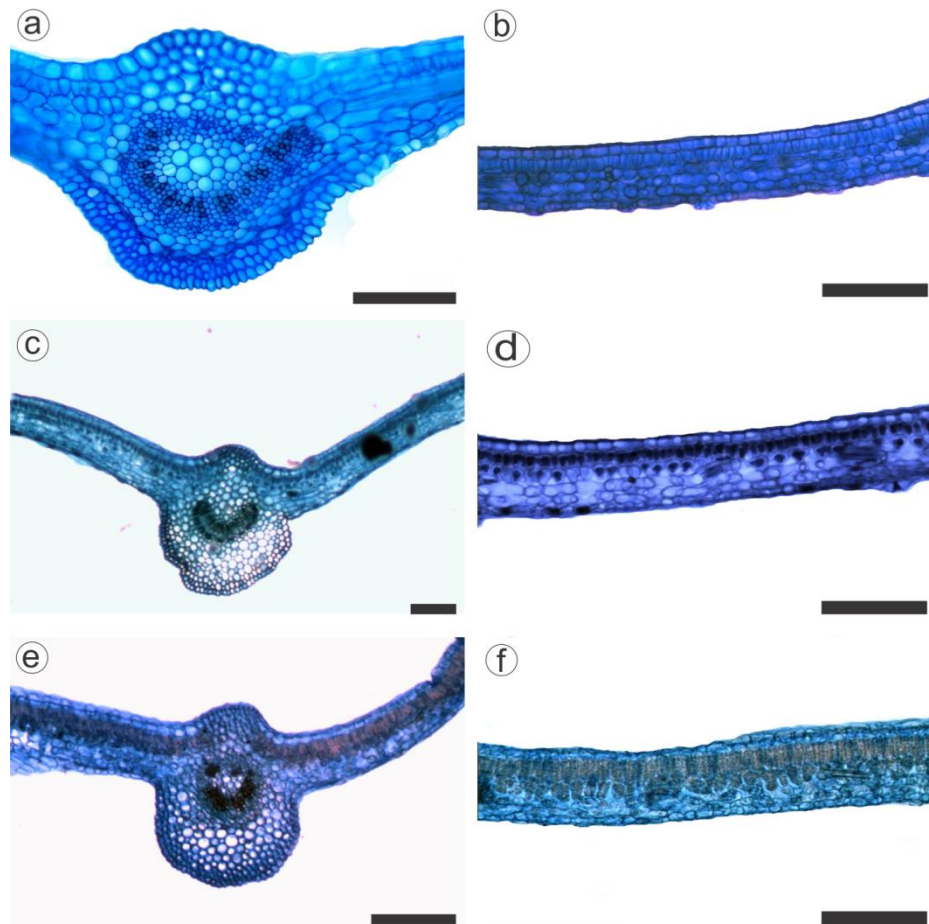


Fig 4. Secções transversais da nervura e do limbo de *Genipa americana* cultivadas *in vitro* (a e b); aos 14 dias (c e d) 28 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* (e-f). Barras= 10µm.

Dessa forma, verifica-se que houve alteração no formato dos estômatos de esférico para elíptico durante a aclimatização, o que reflete maior funcionalidade dos mesmos. O formato esférico dos estômatos dificulta o processo de fechamento resultando em altas taxas de transpiração e consequentemente, esse é um dos fatores que mais contribui para perda de água em plantas micropropagadas durante a transferência para condições *ex vitro* (Kumar e Rao 2012; Asayesh et al. 2017). Além disso, foi verificada outras estratégias adaptativas das

plantas aclimatizadas como, o desenvolvimento de mecanismos que possibilitem maior absorção e redistribuição de luz e CO₂ proporcionados pelo formato convexo de paredes das células da epiderme adaxial e aumento dos espaços entre as células do parênquima lacunar, essas modificações contribuem para o aumento da eficiência fotossintética (Lando et al. 2016).

Com relação às raízes, foi observado que as mesmas formadas *in vitro* sobreviveram após a transferência para as condições *ex vitro* e continuaram a crescer durante a aclimatização (Fig 2c). Segundo Mali e Chavan (2016) o sucesso na regeneração *in vitro* depende não só da multiplicação de brotos como da produção de plântulas com raízes normais, o que é fundamental para o estabelecimento e sobrevivência das plântulas em condições de campo. Essa afirmação indica que o protocolo de regeneração obtido recentemente para essa espécie é eficiente (Souza et al. 2018). Além da persistência de raízes formadas *in vitro*, verificamos que às alterações anatômicas ocorridas durante a aclimatização foi essencial, garantindo alta taxa de sobrevivência das mudas micropropagadas na condição *ex vitro*.

Em condições *in vitro*, as raízes apresentaram cilindro com medula parenquimática contornada por elementos traqueais de metaxilema e uma fina camada de floema (Fig 5a-b), além de parênquima cortical com presença de estruturas de aerênquima (Fig 5a-seta). A presença dessas estruturas pode ser de natureza constitutiva, visto que a espécie é tolerante a condições de alagamento (Santiago e Paoli 2007). Além disso, a presença de umidade relativa do ar alta e a menor ventilação sob condições *in vitro* podem ter contribuído para o aparecimento em maior frequência dessas estruturas. Isso porque em condições saturadas de umidade do ar, e baixa disponibilidade de oxigênio as plantas são mais sensíveis ao etileno, principal hormônio envolvido na formação de aerênquima (Calco-Bolanco et al. 2017).

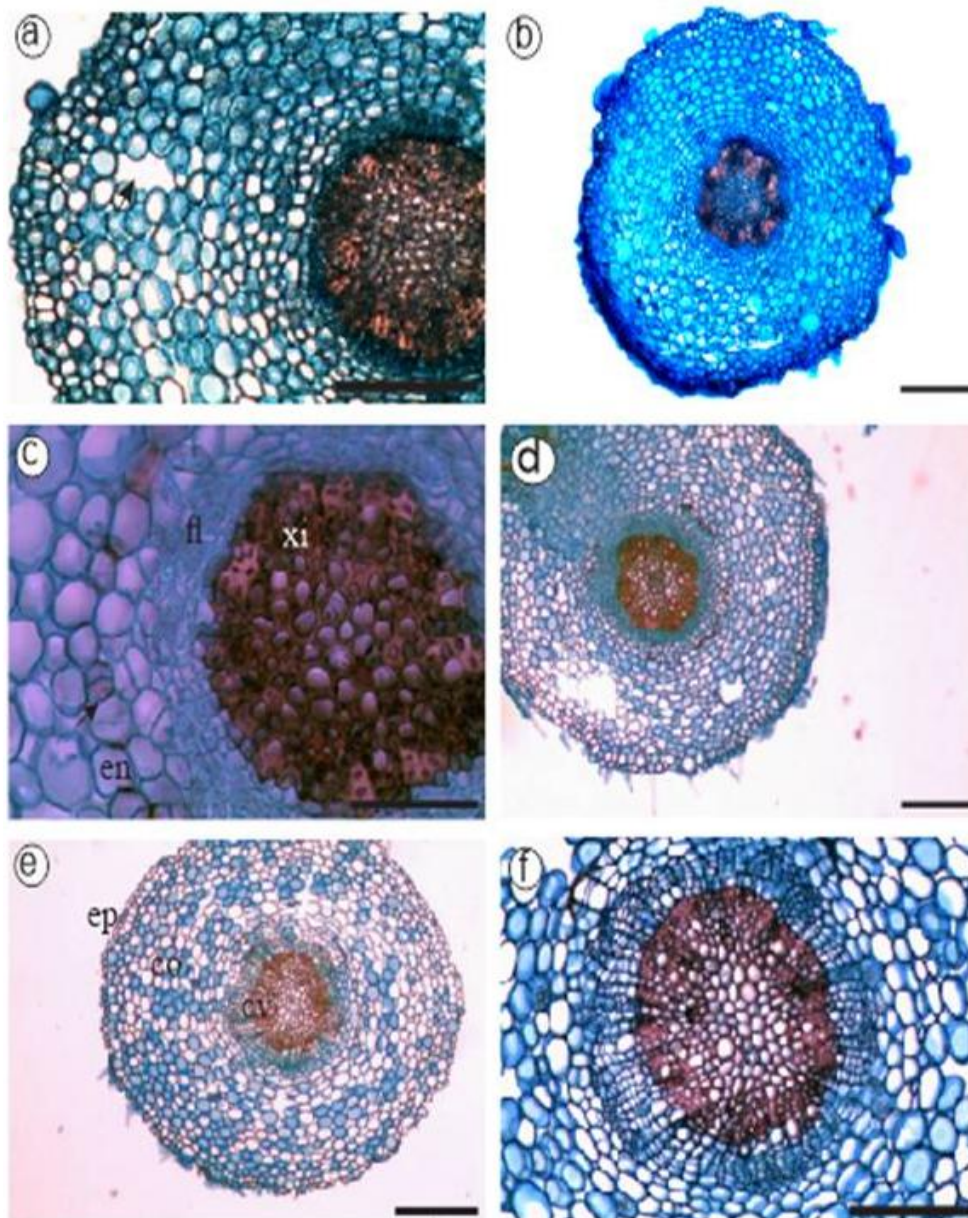


Fig 5. Seções transversais de raízes de *Genipa americana* cultivadas *in vitro* (a e b); aos 7 dias (c) 14 dias (d) e aos 28 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* (e-f); ep= epiderme, co= córtex, cv= cilindro vascular, en= endoderme, fl= floema, xi= xilema, seta= células em divisão periclinal. Barras= 50 μ m.

Aos 7 dias após a transferência para condições *ex vitro* foi possível observar maior diferenciação na endoderme com presença de células em divisões periclinais e anticlinais (Fig 5c-d). As alterações continuaram ao longo do processo de aclimatização, resultado na emissão

de raízes laterais (Fig 5d), expansão do córtex e aumento dos elementos de condução do xilema e floema (Fig 5e-f). Todas essas modificações indicam adaptação á condições *ex vitro*, permitindo tanto à obtenção de água e nutrientes que anteriormente (*in vitro*) estavam facilmente disponíveis, como aumento da condutividade hidráulica da raiz e controle do fluxo de água no interior das plantas. Todas as alterações morfoanatômicas observadas em folhas e raízes são relevantes, e permitem um maior controle tanto da perda de água, como da manutenção do fluxo de água no interior das plantas, devido ao estabelecimento de uma maior conexão vascular e maior funcionalidade dos estômatos (Charari-Rkhi et al. 2015; Asayesh et al. 2017).

Dessa forma, os resultados demonstram que as modificações ocorridas durante o processo de aclimatização de plântulas de *G. americana* foram eficientes permitindo suportar as alterações ambientais quando expostas á condições *ex vitro*, o que reflete alta plasticidade fenotípica dessa espécie possibilitando maiores taxas de sobrevivência após a aclimatização.

Conclusões

O presente estudo descreve pela primeira vez o desempenho de plântulas micropropagadas de *G. Americana* durante o estabelecimento *ex vitro*. Os resultados obtidos confirmam que a aclimatização bem-sucedida é resultante de mudanças em suas características morfoanatômicas e fisiológicas que permitiram melhor desempenho e aclimatação das plantas ao ambiente *ex vitro*, assegurando a continuidade do crescimento e alta taxa de sobrevivência (90%) após aclimatização.

Referências

- Ahmed MR, Anis M (2014) Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 50:601–609.
- Asayesh ZM, Vahdati K, Aliniaiefard S (2017) Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of *in vitro* walnut plants. *Scientia Horticulturae* 224:1–7.
- Calco-Bolanco M, Ibor P, Molina S, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño AM, García-Mina JM, Aroca R (2017) Ethylene sensitivity and relative air humidity regulate root hydraulic properties in tomato plants. *Planta* 246:987-997.
- Campelo S, Iwakiri S, Trianoski R, Aguiar OR (2017) Utilização da madeira de *Genipa americana* para produção de painéis de colagem lateral – EGP. *Floresta* 47:129-135.
- Chaari-Rkhis A, Maalej M, Chelli-Chaabouni A, Fki L, Drira N (2015) Photosynthesis parameters during acclimatization of *in vitro*-grown olive plantlets. Brief communication. *Photosynthetica* 53:613-616.
- Deccetti SFC, Soares AM, Paiva R, Castro EM (2008) Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. *Scientia Horticulturae* 117:341–344.
- Faisal M, Anis M (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:125–132, 2009.
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38:109–112. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-7054201400020000>
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59:309-314.

- Gonçalves S, Martins N, Romano A (2017) Physiological traits and oxidative stress markers during acclimatization of micropropagated plants from two endangered *Plantago* species: *P. algarbiensis* Samp. and *P. almogravensis* Franco. *In vitro Cell Dev Bio-Plant* 53:249-255.
- Ivanchenko MG, Den OD, Monshausen GB, Dubrovsky JG, Bednářová A, Krishnan N (2013) Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of Botany* 112:1107–1116.
- Kondamudi R, Sumar K, Swamy KN, Murthy KSR (2017) Role of Antioxidant Enzymes in Acclimatization of *Ceropegia spiralis* Wt., *C. pusilla* Wt. and Arn. and *C. juncea* Roxb. *International Journal of Advanced Research in Botany* 3:19-27.
- Konieczny R, Banas AK, Surówka E, Michalec Z, Miszalski Z, Libik-Konieczny (2014) Pattern of antioxidant enzyme activities and hydrogen peroxide content during developmental stages of rhizogenesis from hypocotyl explants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Rep* 33:165–177.
- Kumar K, Rao IU (2012) Morphophysiological Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in-*Ex vitro* Conditions-A Reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 2:271-283.
- Lando AP, Wolfart MR, Fermino Jr PCP, Santos M (2016) Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. *Biologia Plantarum* 60:219-225.
- Lima-Brito A, Albuquerque MMS, Resende SV, Carneiro CE, Santana JRF (2016) Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *Mucugensis*. *Revista Ciência Agronômica* 47:152-161.
- Lloyd G, Mc Cown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture Combined Proceedings. *Int. Plant Propagators' Soc* 30:421–427.

- Mali AM, Chavan NS (2016) *In vitro* rapid regeneration through direct organogenesis and *ex vitro* establishment of *Cucumis trigonus* Roxb - An underutilized pharmaceutically important cucurbit. *Industrial Crops and Products* 83:48–54.
- Martins JPR, Schimildt ER, Alexandre RS, Falqueto AR, Otoni WC (2015) Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentric* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 51:471–481.
- Mengutay M, Ceylan Y, Kutman UB, Cakmak I (2013) Adequate magnesium nutrition mitigates adverse effects of heat stress on maize and wheat. *Plant and soil* 368:57-72.
- Mohamed AA (2008) Efeitos promotores de um fertilizante à base de ácido 5-aminolevulínico no crescimento de plantas de tamareira derivadas de cultura de tecidos (*Phoenix dactylifera* L.) durante a aclimatização. *Sci Hortic* 118: 48–52.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473–497.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology* 22:867-880.
- Rodrigues M, Paiva PDO, Freitas RT, Mansur TOF, Paiva R, Barbosa JPRAD (2015) Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etilingera Elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). *Acta Scientiarum. Agronomy* 37:495-504.
- Sá FP, Ledo AS, Amorim JAE, Silva AVC, Pasqual M (2016) *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. *Ciência e Agrotecnologia* 40:155-163.
- Santana KB, Almeida AF, Souza VL, Mangabeira PAO, Silva DC, Gomes FP, Putruch L, Loguercio LL (2012) Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. *Environmental and Experimental Botany* 80:35-42.
- Santhoshkumar J, Rajeshkumar S, Venkat Kumar S (2017) Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles – A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 11:46-57.

- Santiago EF, Paoli AAS (2007) Respostas morfológicas em *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard (Fabaceae) e *Genipa americana* L. (Rubiaceae), submetidas ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato. *Revista Brasileira de Botânica* 30:131-140.
- Sik-Shin K, Park SY, Paek K (2014) Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. *Environmental and Experimental Botany* 100:26– 33.
- Souza RR, Paiva PDO, Silva RR, Reis MV, Silva DPC, Paiva R (2018) Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *Genipa sp. in vitro* regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (No prelo).
- Souza RR, Beckmann-Cavalcante MZ, Silva EM, Amaral GC, Brito LPS, Avelino RC (2016) Alterações morfofisiológicas e crescimento de helicônias em função de diferentes ambientes de sombreamento. *Comunicata Scientiae* 7:214-222.
- Sridharan G, Shankar AA (2012) Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 16:251-255.

ARTIGO 3- Cryopreservation of *Genipa americana* seeds
Submetido ao periódico: Fruits

Cryopreservation of *Genipa americana* seeds

Rafaela Ribeiro de Souza¹, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva², Rodrigo Therezan de Freitas³,
Diogo Pedrosa Corrêa da Silva², Michele Valquíria dos Reis¹, Fernanda Carlota Nery⁴,
Renato Paiva¹

1 Federal University of Lavras, Department of Biology, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brazil. * Corresponding author: rfag.fisio@gmail.com

2 Federal University of Lavras, Department of Agriculture, Lavras-MG, Brazil.

3 School of Agriculture "Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, Brazil.

4 Federal University of São João Del Rei, Department of Bossystems engineering, São João Del Rei-MG, Brazil.

ABSTRACT

Introduction - The jenipapeiro (*Genipa americana* L). is a forest species of high socioeconomic potential. However, predatory extractivism actions threaten its existence, making it necessary to adopt conservationist practices. However, *G. americana* seeds show sensitivity to desiccation and cooling, making it unfeasible for conservation by conventional methods. Cryopreservation is the most promising alternative for the long-term conservation of species that produce of recalcitrant or intermediate seeds, such as the genipap. The objective of this study was to cryopreservation of seeds of *G. americana* and to evaluate the effects of desiccation and freezing on germination and establishment of seedlings. **Materials and methods** - Initially, the seeds were dehydrated in silica gel (0, 16, 18, 20, 22 and 24 h), and then were cryopreserved in liquid nitrogen (LN) (-196°). After thawing, the viability and germination were analyzed. Dehydrated and non-cryopreserved seeds were also analyzed. **Results and discussion** - The silica gel desiccation period promoted a significant reduction in viability and germination. However, initial seed water content was so high (47%) that storage in NL (+LN) without prior dehydration treatment resulted in seed mortality. It was verified that, the removal of up to 14% of seeds water content gave a higher freezing tolerance, allowing the successful cryopreservation. **Conclusion** - Silica gel dehydration followed by immersion in NL was shown to be highly efficient for cryopreservation of seeds

of *Genipa americana* L., besides germination (35%) after thawing, high survival rates (100%), with growth and normal establishment of the seedlings after acclimatization.

Keywords: Brazil, Jenipapeiro, long-term storage, Rubiaceae

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Genipapo seeds show sensitivity to desiccation and cooling. In addition, they lose viability in a short period, precluding their conservation using "conventional" storage practices, such as seed banks.

What are the new findings?

- The removal of up to 14% seed water content (corresponding 20 h dehydration) induced to a higher freezing tolerance. Thus, silica gel dehydration followed by immersion in LN shown to be highly efficient for cryopreservation of seeds of *Genipa americana*.

What is the expected impact on horticulture?

- This work enhances the potential of horticulture for continuous availability of germplasm of *G. americana* in breeding programs and provide support for further research on the exploitation of active biomolecules.

Introduction

Genipa americana is a tree species belonging to the Rubiaceae family and shows high socioeconomic potential due to its medicinal, ornamental, wood and food attributes (Almeida et al., 2015; Souza et al., 2016). Due to the presence of hygrophytic and phytoremediation selectivity, it is highly recommended for recovery of degraded areas and restoration of riparian forests (Santana et al., 2012).

However, predatory extractivism associated with actions such as deforestation, burning and mining compromise the existence of this species (Vieira and Martins, 2000), thus stimulating the adoption of conservationist practices. Genipapo seeds show sensitivity to

desiccation, in addition, they lose viability in a short period, precluding their conservation using "conventional" storage practices, such as seed banks (Salla et al., 2016). Alternatively, cryopreservation of biological material at ultra-low temperatures (-196°C) using liquid nitrogen (LN) is a promising alternative for the long-term conservation of recalcitrant or intermediate germplasm, such as the genipap (Naidoo et al., 2016). In addition to storage without damage for an indefinite period, it allows the maintenance of genetic stability, low space requirements, absence of contaminants and low maintenance need (Folgado et al., 2014).

The use of plant material in the form of zygotic embryos and seeds is preferred and has been successfully used for cryopreservation of several species that show seeds with unorthodox behavior (Freitas et al., 2016; Pinto et al., 2016). The preference for the use of these structures is attributed to the fact that it constitutes a more organized system and allows forming an entire plant, dispensing more complex stages of *in vitro* cultivation (Ballesteros et al., 2014). However, large seed size, irregular geometry and high moisture content hinders to prevent intracellular ice formation and is the main challenge of cryopreservation (Wesley-Smith et al., 2015).

Success in cryopreservation depends on the prevention of lethal damage to cell membranes and organelles. Typically, these damages are associated with water content and expansion characteristics during freezing and with conformation of ice crystals inside cells (Wesley-Smith et al., 2015). Thus, the adjustment of the water content inside cells, triggered by the explant dehydration before freezing, is fundamental (Ninagawa et al., 2016).

The dehydration conferred by the material exposure to silica gel is advantageous both because it is an easy and low cost technique and because it allows preserving the dried material directly in LN without the use of cryoprotectants that can present toxicity to the cells

(Sisunandar et al., 2010; Wu et al., 2013; Prada et al., 2015). Furthermore, it is a technique that has been shown to be effective in cryopreservation of several seed species of the Rubiaceae family (Wu et al., 2013; Pinto et al., 2016). However, there is little information on the tolerance of genipapo seeds to freezing (Santos and Salomão, 2016) and there is no well-established cryopreservation protocol for this species. In this context, the aim was to establish a protocol for cryopreservation of *Genipa americana* L. seeds by dehydration in silica gel and the evaluation of the effects of desiccation and freezing on germination and establishment of seedlings.

Material and methods

Ripe fruits of *G. americana* (Figure 1a) were pulped and the seeds were rubbed onto sieve for complete mucilage removal (Souza et al., 2016). For the quantification of the initial water content, three replicates consisting of 25 seeds were used, and the determination was performed by the oven drying method at 105 °C for 24 h.

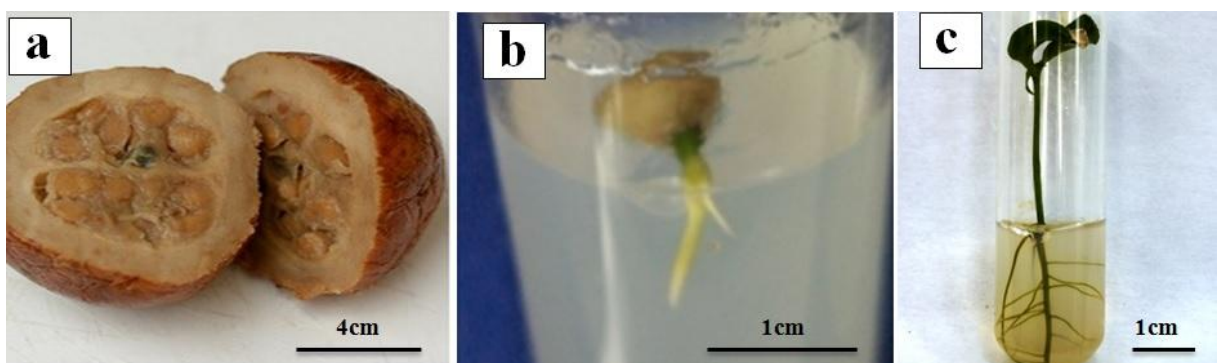


Figure 1. *G. americana*; (a) ripe fruits, (b) seed germination after 13 days of cultivation, (c) seedlings showing a normal development appearance at 60 days after cultivation

After the determination of the initial water content, seeds were dried in a closed container (Gerbox®) containing 80 g of silica gel for 16, 18, 20, 22, and 24 h. Monitoring of

water loss was performed at each dehydration time. In total, 150 seeds were used per treatment, 75 for control treatments (dehydrated at different periods and non-cryopreserved) and 75 for cryopreservation treatments. Seeds dehydrated in each period (Control, 16, 18, 20, 22, and 24 h) were separated, placed in cryotubes (2 mL) and immersed in LN for 24 h. Subsequently, they were subjected to thawing, placing the cryotubes in a water bath at 40 °C for 2 min. After thawing, the seeds were subjected to viability and germination analyses. Dehydrated and non-cryopreserved seeds were also analyzed.

Viability after dehydration and freezing

Embryo excision and submergence in 0.5% solution of 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride for 2 h in the absence of light in a BOD incubator at 30 °C (Clemente et al., 2012) were performed. They were then washed in running water, individually observed and classified as viable or non-viable according to the formed staining. The data were transformed into \sqrt{x} and expressed as a percentage of viable embryos.

Germination

The dehydrated (-LN) and cryopreserved (+LN) seeds were disinfested in 2.5% (v/v) NaOCl solution for 20 min, inoculated in germination medium ($\frac{1}{2}$ MS salts + 15 g L⁻¹ sucrose and 0.7% agar) and stratified in the dark for 16 days. Afterwards, they were transferred to the growth room under controlled conditions of temperature (25 °C), relative humidity (70%), and photoperiod (16 h) (Souza et al., 2016). At 45 days after cultivation, germination (Figura 1b) and normal seedling percentages, shoot length (cm), and root length (cm) were evaluated. Germination was considered as the radicle protrusion accompanied by geotropic curvature, and the well-developed and morphologically perfect seedlings were considered as normal.

Histological analysis

Light microscopy was performed on histological slides of excised embryos from non-cryopreserved seeds with initial water content (Control) and cryopreserved. After thawing, the cryopreserved seed and control treatment embryos were excised, fixed in 70% ethanol and dehydrated in an ethanol gradient (70%, 80%, 90%, and 100%), remaining at each concentration for 1 h. After dehydration, the infiltration with hydroxyethylmethacrylate plastic resin (Leica Histo-resin; Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) was performed according to the manufacturer's instructions. Cross sections of 5 μm thickness were cut with a rotary microtome (Leica RM 2045) and subsequently stained in 0.1% toluidine blue (Sridharan and Shankar, 2012). Sections were observed at 20x magnifications and images were captured digitally using a microscope with a video camera coupled to a computer executing the software IM50 (Leica microsystem).

Acclimatization

At 60 days after cultivation (Figura 1c), seedlings regenerated from non-dehydrated (control) and cryopreserved seeds (+LN) were removed from the test tubes and their roots washed in running water. They were then transferred to polypropylene containers (300 ml) tubes filled with substrate based of vermiculite and peat, and covered with clear plastic in order to avoid excessive moisture loss from the seedlings after transfer from *in vitro* to *ex vitro* environment. Cuts were made every five days in each plastic bag until complete withdrawal at 15 days. The seedlings were kept for 14 days in a growth room with controlled

temperature of 25 ± 2 °C and photon irradiance of $67 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. They were then transferred to greenhouse with a 30% shading screen. At 30 days of acclimatization, the percentage of surviving plants, shoot and root length (cm), and number of leaves were evaluated.

Experimental design and statistical analyses

The experimental design was completely randomized with treatments distributed in a 2x6 factorial design related to storage in LN (non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved in LN (+LN)) and dehydration periods in silica gel (without dehydration, 16, 18, 20, 22, and 24 h). The obtained data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the averages were compared by Skott-Knott test ($p > 0.05$).

Results

G. americana seeds showed initial (control) water content of 47%, with viability and germination of 97% and 83.3%. Reduction of seed water content from 47% (control) to 17% (16 h of desiccation) caused a significant reduction of 28.0% and 11.6% in viability and germination (Table 1).

Table 1. Effect of dehydration in silica gel on water content (%), viability (% \pm SE) and germination (% \pm SE) of *G. americana* L. seeds cryopreserved (+LN) or not (-LN).

Desiccation period	Seed water content (% \pm SE)	Viability (% \pm SE)		Germination (% \pm SE)	
		-LN	+LN	-LN	+LN
Control	47 \pm 0.57 ^a	97.6 \pm 2.2 ^{aA}	0.0 \pm 0.0 ^{cB}	83.3 \pm 8.3 ^{aA}	0.0 \pm 0.0 ^{cB}
16 h	17 \pm 1.66 ^b	69 \pm 2.7 ^{bA}	19.3 \pm 10 ^{bB}	71.7 \pm 4.6 ^{bA}	0.4 \pm 0.3 ^{cB}
18 h	15 \pm 1.66 ^b	60.6 \pm 5.5 ^{bA}	30.3 \pm 2.7 ^{aB}	64.3 \pm 5.6 ^{bA}	0.8 \pm 0.1 ^{cB}
20 h	14 \pm 1.15 ^b	57 \pm 1.6 ^{bA}	38.6 \pm 5.5 ^{aB}	60.1 \pm 2.3 ^{bA}	35 \pm 1.3 ^{aB}

22 h	13±0.88 ^b	57±1.4 ^{bA}	30.3±2.7 ^{aB}	72.2±2.7 ^{bA}	24.0±0.9 ^{bB}
24 h	11.3±1.33 ^b	58±9.6 ^{bA}	30.3±2.7 ^{aB}	68.0±3.6 ^{bA}	21.9±0.3 ^{bB}

Data were expressed as average ± standard errors (SE). Averages followed by the same capital letter on the column and lowercase on the line do not differ among themselves by Scott-Knott test ($p < 0.05$).

However, it was observed that the dehydration performed before freezing was essential for cryopreservation, since non-dehydrated seeds did not show viability and germination after thawing (+LN). It was also verified that the highest percentages of viability (38%) and germination (35%) after thawing were obtained in seeds dehydrated for 20 h (14% water content) (Table 1).

Cryopreserved seeds (+LN) showed higher percentages of normal seedlings when dehydrated for 18 and 20 h. In these dehydration periods, normal seedlings with similar percentages were obtained in treatments corresponding to cryopreserved (+LN) and non-cryopreserved (-LN) seeds (Table 2).

Table 2. Effect of dehydration in silica gel on the percentage of normal seedlings (% ± SE), shoot length (cm ± SE), and root length (cm ± SE) of regenerated seedlings of *G. americana* L. cryopreserved (+ LN) or not (-LN).

Desiccation period	Normal seedlings (% ± SE)		Shoot length (cm ± SE)		Root length (cm ± SE)	
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
Control	100±0.0 ^{aA}	0.0±0.0 ^{dB}	6.2±0.0 ^{Aa}	0.0±0.0 ^{cB}	4.14±0.005 ^{dA}	0.0±0.0 ^{eB}
16 h	100±0.0 ^{aA}	0.0±0.0 ^{dB}	5.4±0.13 ^{bA}	0.0 ±0.0 ^{cB}	4.68±0.03 ^{bA}	0.0±0.0 ^{eB}
18 h	100±0.0 ^{aA}	100±0.0 ^{aA}	5.1±0.12 ^{bA}	2.7±0.04 ^{bB}	4.61±0.04 ^{bA}	3.97±0.01 ^{cB}
20 h	92.3±0.6 ^{bA}	94.7±0.5 ^{aA}	4.9±0.13 ^{cA}	3.0±0.05 ^{aB}	4.95±0.01 ^{aA}	4.51±0.06 ^{aB}
22 h	91.6±3.9 ^{bA}	75.0±1.5 ^{bB}	5.1±0.10 ^{bA}	3.1±0.06 ^{aB}	4.96±0.02 ^{aA}	3.70±0.02 ^{dB}

24 h	87.5±0.5 ^{cA}	60±0.7 ^{cB}	4.9±0.10 ^{cA}	3.1±0.09 ^{aB}	4.50±0.02 ^{cA}	4.16±0.08 ^{bB}
------	------------------------	----------------------	------------------------	------------------------	-------------------------	-------------------------

Data are expressed as average ± standard errors (SE). Averages followed by the same capital letter on the column and lowercase on the line do not differ among themselves by Scott-Knott test ($p < 0.05$).

The shoot and root length of seedlings obtained from cryopreserved and non-cryopreserved seeds were affected by dehydration (Table 2). Seedlings from non-cryopreserved (-LN) and non-dehydrated seeds (Control) showed higher height values, while seedlings obtained from seeds dehydrated for 20 and 22 h showed higher values in root length (4.95 cm and 4.96 cm respectively). For cryopreserved seeds (+LN), it was verified that the dehydration for 20 h contributed to an increase in the height and root length of seedlings.

The seedlings showed 100% survival in acclimatization and no differences were observed in relation to the growth between regenerated seedlings of cryopreserved and non-cryopreserved seeds. The average values obtained in height and root length from regenerated seedlings of cryopreserved seeds were 5.0 cm and 7.7 cm, while seedlings obtained from non-cryopreserved seeds showed an average height of 6.7 cm and average root length of 9.0 cm (data not shown).

Discussions

G. americana seeds are highly sensitive to dehydration. It was observed that the reduction of water content to 17% (16 h of desiccation) was sufficient to cause reduction in viability and germination of non-cryopreserved seeds (-LN). Similarly, Sala et al. (2016) evaluated the behavior of dehydrated *G. americana* seeds in saturated solution of sodium chloride and silica gel and verified that desiccation at a water content of approximately 15% resulted in a reduction in viability and germination. However, the available information

regarding the tolerance to desiccation of *G. americana* seeds is contradictory. For some authors (Carvalho and Nascimento, 2000; Magistrali et al., 2013; Santos and Salomão, 2016), seeds tolerate desiccation at low water content (approximately 5%) without loss of viability and germination potential.

The variation of responses in the different studies may be related to several factors that directly interfere in the behavior and degree of tolerance to desiccation, such as: maturity stage of the seeds, employed method, intensity and duration of drying (Magistrali et al., 2013). Furthermore, the seed variability and its complex structure with very heterogeneous cell composition can result in sensitivity and unequal drying rates within the same seed batch. (Ballesteros et al., 2014; Sahu et al., 2017).

Despite the reduction in the water content, the seed viability and seed germination decreased. Dehydration was critical for survival after thawing. However, the initial water content (47%) of *G. americana* seeds was so high that storage in LN (+LN) without previous dehydration treatment resulted in total seed mortality (Table 1). The high water content in the cells during freezing favors the formation of ice crystals, causing lethal damage to the membranes and hence leading to cell death (Wesley-Smith et al., 2015). In order to avoid damage caused by freezing and desiccation (Ballesteros et al., 2014; Ninagawa et al., 2016), the adjustment of the amount of water present in explants before immersion in LN is fundamental.

Drying of *G. americana* seeds for 20 h in silica gel (14% water content), allowed obtaining better rates of viability, germination and formation of normal seedlings after storage in LN (Table 1 and 2). This result indicates that drying provided by the exposure of seeds to silica for 20 h contributed to the occurrence of the vitreous state, resulting from the increase in cytoplasmic viscosity and low cell mobility, conferring better tolerance to freezing (Wowk, 2010; Ballesteros et al., 2014).

Cryopreserved (+LN) seeds compared to non-cryopreserved seeds (-LN) showed lower viability and germination. Additionally, some seedlings showed reduced growth, with slow and abnormal development (Figure 2a-b). Freezing induces a series of stresses on the plant material, making it susceptible to modifications in the ultrastructural organization of cells and subsequent growth (Galdiano et al., 2012). However, it is important to note that the pretreatment of dehydration allowed an increase in growth parameters on seedlings obtained from cryopreserved seeds. Moreover, removal of water content from seeds at 14% (corresponding to dehydration for 20 h) before immersion in LN allowed the successful cryopreservation of *G. americana* seeds, contributing to obtain normal seedlings with similar rates among cryopreserved and non-cryopreserved seeds.

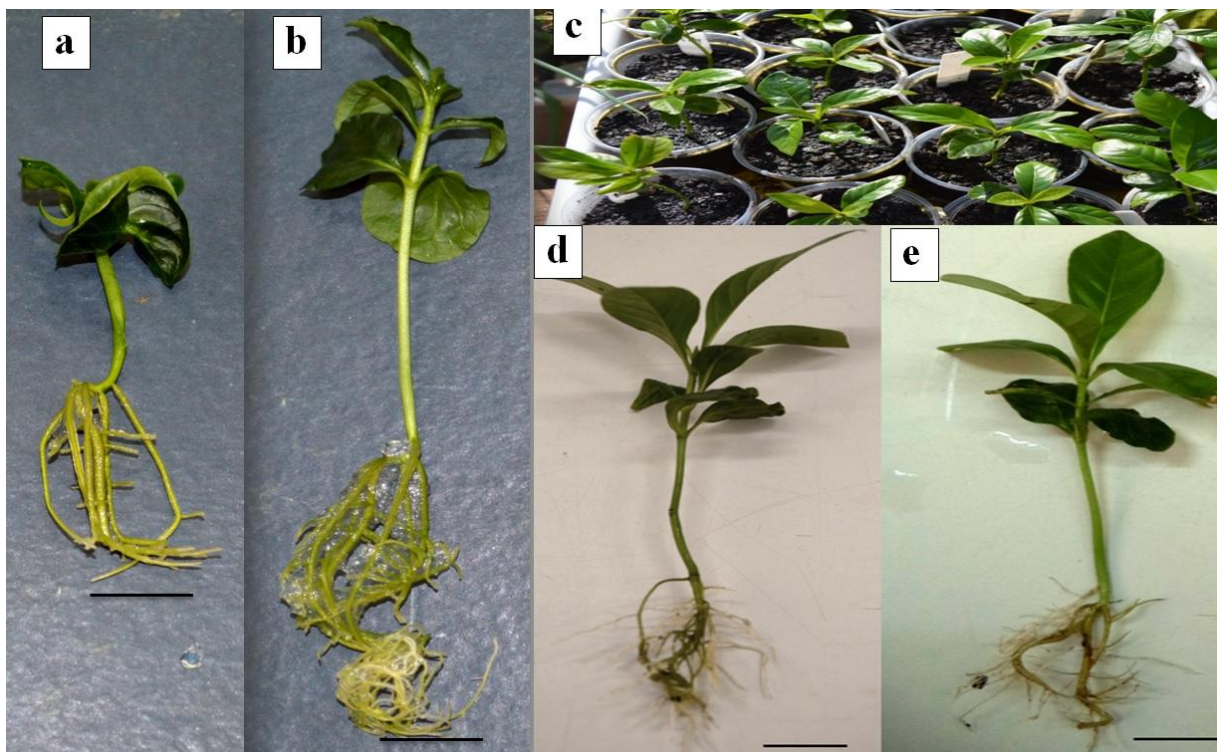


Figure 2: *G. americana* seedlings after 60 days of cultivation from cryopreserved (a), non cryopreserved seeds (b), *ex vitro* acclimatization (c), seedlings after acclimatization, showing normal appearance and without phenotypic changes from cryopreserved (d) and non-cryopreserved (e) seeds. bar: 1 cm.

In studies on plant cryopreservation, only the evaluation of cell survival after freezing is performed. However, in order to obtain an efficient cryopreservation protocol, the viability of the material subjected to freezing in LN should be referred as the recoverability of the largest amount of living cells that provide the regeneration and recovery of individual's normal growth. Consequently, higher survival rates of seedlings and the establishment in greenhouses and field are expected, besides maintaining genetic integrity (Bárbara et al., 2015; Li et al., 2016).

The observation of histological sections of embryos excised from cryopreserved seeds revealed intact protoderm cell contents and without the presence of large intercellular spaces, with characteristics similar to embryos excised from non-cryopreserved seeds (Figure 3a-b), indicating high cell recovery capacity after cryopreservation of *G. americana* seeds.

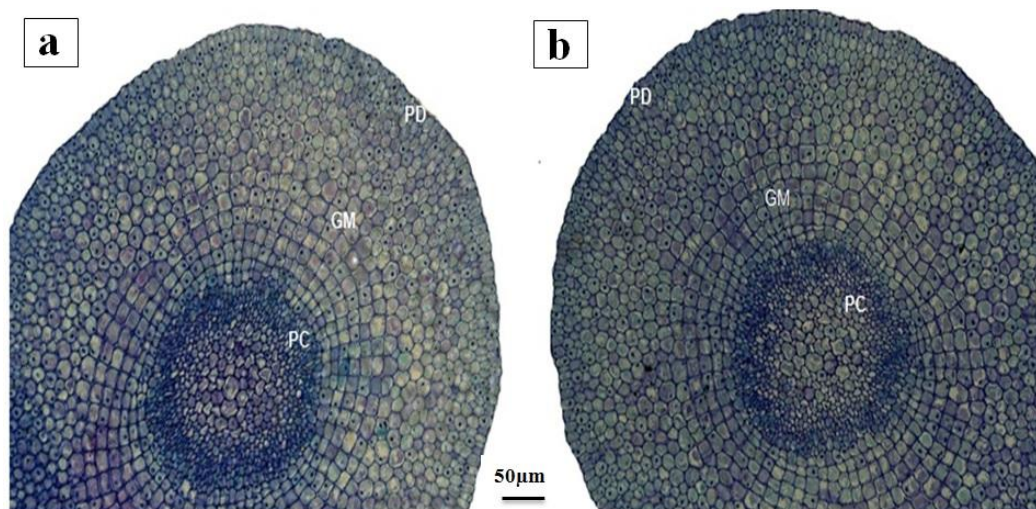


Figure 3. Histological section of embryos excised from non-cryopreserved seeds (control) medium radicle segment (20x magnification) (a), histological section of embryos excised from cryopreserved seeds (20x magnification) (b). PD - protoderm; GM – ground meristem; PC - procambium

The regenerated seedlings of cryopreserved and non-cryopreserved seeds (Control) were acclimatized with 100% survival (Figure 2c), with no phenotypic differences (Figure 2d-e) or growth parameters (shoot length or root length and number of leaves) between the cryopreserved and non-cryopreserved phenotype.

Dehydration in silica gel followed by immersion in LN is a simple, easy and low cost technique that proved to be efficient for cryopreservation of *G. americana* seeds, besides allowing germination after thawing, high survival rates, with growth and normal establishment of seedlings after acclimatization.

Conclusion

Dehydration in silica gel for 20 h (14% water content) allows *G. americana* seeds being successfully cryopreserved, allowing germination after thawing (35%), high survival rates (100%), with growth and normal establishment of seedlings after acclimatization.

Acknowledgements

The authors thank to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for Supporting Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for granting scholarships.

Conflicts of interest

All authors have declared no conflict of interest.

References

- Almeida, C.S., silva, A.V.C., Araújo, A.G., Lédo, A.S. (2015). Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. *Revista Caatinga*. 28(1), 58-64.
- Ballesteros, D., Sershen, Varghese, B., Berjak, P., Pammenter, N.W. (2014). Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation. *Cryobiology*. 69(1), 100-109.
- Bárbara, E.P.S., Silva, A.A., Souza, M.M.O.R., Gurgel, Z.E.R., Marchi, M.N.G., Bellintani, M.C. (2015). Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da bahia. *Gaia scientiae*. 9(2), 91-96.
- Carvalho, J.E.U., Nascimento, W.M.O. (2000). Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 22(1), 53-56.
- Clemente, A.D.C.S., Carvalho, M.L.M., Guimarães, R.M. (2012). Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. *Ciência e Agrotecnologia*. 36(4), 415-423.
- Folgado, R., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., Hausman, J., Panis, B. (2014). Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. *Cryobiology*. 71(3), 432-441.
- Freitas, R.T., Paiva, R., Sales, T.S., Silva, D.P.C., Reis, M.V., Souza, A.C., Rosa, S.D.V.F. (2016). Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 44(2), 445-451.

Galdiano J.R.R.F., Lemos, E.G.M., Faria, R.T., Vendrame, W.A. (2012). Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*. 148(8), 154-160.

Li, J-W., Li, H-H., Wang, R-R., Gao, X-X., Wang, Q-C. (2016). Cryopreservation for retaining morphology, genetic integrity, and foreign genes in transgenic plants of *Torenia fournieri*. *Acta Physiol Plant*. 38(1), 1-8.

Magistrali, P.R., José, A.C., Faria, J.M.R., Gasparin, E. (2013). Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. *Journal of Seed Science*. 35(4), 495-500.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15(3), 473-497.

Naidoo, C., Berjak, P., Pammenter, N.W., Varghese, B. (2016). The role of reactive oxygen species and antioxidants during precooling stages of axis cryopreservation in recalcitrant *Trichilia dregeana*. *Botany*. 94(5), 391-403.

Ninagawa, T., Eguchi, A., Kawamura, Y., Konishi, T., Narumi, A. (2016). A study on ice crystal formation behavior at intracellular freezing of plant cells using a high-speed camera. *Cryobiology*. 73(1), 20-29.

Pinto, M.S., Paiva, R., Silva, D.P.C., Santos, P.A.A., Freitas, R.T., Silva L.C. (2016). Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. *Ciência e Agrotecnologia*. 40(4), 380-389.

Prada, J.A., Aguilar, M.E., Abdelnour-Esquivel, A., Engelmann, F. (2015). Cryopreservation of seeds and embryos of *Jatropha curcas* L. American Journal of Plant Sciences. 6(1), 172-180.

Sahu, B., Sahu, A.K., Chennareddy, S.R., Soni, A., Naithani, S.C. (2017). Insights on germinability and desiccation tolerance in developing neem seeds (*Azadirachta indica*): Role of AOS, antioxidative enzymes and dehydrin-like protein. Plant Physiology and Biochemistry. 112(3), 64-73.

Salla, F; José, A.C., Faria, J.M.R. (2016). Análise ecofisiológica de *Genipa americana* L. em banco de sementes induzido. Cerne. 22(1), 93-100.

Santana, K. B., Almeida, A. F., Souza, V. L., Mangabeira, P. A. O., Silva, D. C., Gomes, F. P., Dutruch, L., Loguercio, L. L. (2012). Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. Environmental and Experimental Botany. 80(2), 35-42.

Santos, I.R.I., and Salomão, A.N. (2016). Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using *in vitro* culture. International Journal of Agronomy. 2016(4), 1-6.

Sisunandar, Sopade, P.A., Samosir, Y.M., Rival, A., Adkins, S.W. (2010). Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). Cryobiology. 61(3), 289-296.

Souza, R.R., Paiva, P.D.O., Silva, R.R., Reis, M.V., Nery, F.C., Paiva, R. (2016). Optimizing of the *in vitro* jenipapo seeds germination process. Ciência e Agrotecnologia. 40(6), 155-163.

Sridharan, G., Shankar, A.A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 16(2), 251-255.

Vieira, R.F., and Martins, M.V.M. (2000). Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3(1), 13-36.

Wesley-Smith, J., Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P. (2015). Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Annals of Botany*. 115(6), 991-1000.

Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 60(1), 11-22.

Wu, R.Y., Chang, S-Y., Hsieh, T-F., Chang, Y-S. (2013). Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. *Scientia Horticulturae*. 157(7), 108-112.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as pesquisas realizadas, pode-se inferir que foi obtido um sistema eficiente de regeneração *in vitro* de *G. americana*. O qual além de ser aplicável a diferentes explantes (hipocótilo, raiz e folhas) utilizando baixa concentração de BAP (1.12 mg L^{-1}), permite a clonagem em grande escala e obtenção de mudas micropropagadas dessa espécie em menor tempo. Adicionalmente, foi observado que a aclimatização bem-sucedida de plantas micropropagadas de *G. Americana* é resultante de mudanças em suas características morfoanatômicas e fisiológicas que permitiram melhor desempenho e aclimação das plantas ao ambiente *ex vitro*, assegurando a continuidade do crescimento e alta taxa de sobrevivência (90%) após aclimatização. O que indica alta plasticidade fenotípica dessa espécie. Além do estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração *in vitro* para essa espécie foi possível elaborar um protocolo de criopreservação de sementes por meio da desidratação em sílica gel. A metodologia estabelecida além de ser simples e de fácil execução possibilitará a conservação em longo prazo de germoplasma de *G. americana*.