

## Aplicações de técnicas para conservação a longo prazo de recursos genéticos de mangabeira

PEDRAL, Daniela França de Oliveira<sup>1</sup>; SANTANA, Fernanda Vieira<sup>2</sup>; MALSCHITZKY, Sofia Amaral<sup>3</sup>; SILVA JÚNIOR, Josué Francisco da<sup>4</sup>; SILVA, Ana Veruska Cruz da<sup>5</sup>; LEDO, Ana da Silva<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Engenheira Florestal, mestre em Agricultura e Biodiversidade, PPGAGRI/UFS, São Cristóvão, SE.

<sup>3</sup> Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/FAPITEC-SE/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, mestre em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

**Resumo** - O trabalho teve como objetivo analisar e validar o protocolo de encapsulamento-vitrificação de acesso de mangabeira do Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Foram utilizados ápices caulinares provenientes de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*. Os explantes foram pré-cultivados por 30 dias em três meios, sendo o M1 composto por WPM, prolina e sacarose e o M2, por WPM, prolina, ABA e sacarose e o M3, por WPM, ABA e sacarose. Após o pré-cultivo, os ápices foram encapsulados e submetidos ao processo de criopreservação. Após 24 horas, as cápsulas foram descongeladas e os explantes cultivados em meio de pós-cultivo e mantidos por 24 horas na ausência de luz. No final desse período, foram transferidas para meio de regeneração, sendo mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas. As variáveis porcentagem de sobrevivência foram tomadas aos 30, 60 e 90 dias. A sobrevivência dos explantes ao encapsulamento-vitrificação foi de 70% para o M1; 60% para o M2 e 0% para o M3. Foi observado uma maior eficiência dos meios de pré-cultivo contendo prolina na sobrevivência dos explantes.

**Termos para indexação:** *Hancornia speciosa* Gomes; Encapsulamento-vitrificação; Conservação; Mangaba.

### Introdução

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore de porte médio pertencente à família Apocynaceae que possui uma altura variável de quatro a sete metros, com crescimento lento e copa ampla, possuindo látex de cor branca ou róseo-pálida (Monachino, 1945). Seu fruto, a mangaba, é do tipo baga elipsoidal, contendo entre duas e 15 sementes chatas e com polpa de sabor suave. É uma planta nativa do Brasil, sendo vista nas regiões dos tabuleiros costeiros, cerrados e chapadas do país. Possui uma importância econômica e cultural em comunidades que dependem do seu extrativismo, como o exemplo das catadoras de mangaba em Sergipe. Por estarem localizadas em regiões de grande especulação imobiliária e constantes práticas agrícolas, a mangabeira corre o risco de extinção em algumas áreas de ocorrência. Para evitar a perda da variabilidade da espécie, se torna necessário a busca por alternativas de conservação e preservação desse material genético. Assim, a criopreservação se torna uma alternativa para a problemática.

A criopreservação consiste no processo de congelamento do material em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196 °C para que as atividades celulares sejam reduzidas, evitando a degradação do material genético e a morte celular.

O trabalho teve como objetivo analisar e validar o protocolo de encapsulamento-vitrificação e verificar a resposta dos acessos de mangabeira do Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros à essa técnica de criopreservação.

### Material e métodos

Para o início das atividades, foi realizada a coleta de frutos maduros (“de caída”) de mangabeira no Banco Ativo de Germoplasma (BAG Mangaba) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Itaporanga d’Ajuda, Sergipe. Em seguida, o material coletado foi transferido ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Aracaju, Sergipe. A extração das sementes ocorreu por meio de despulpamento manual com lavagem em polisorbato 20 e água estéril para retirada total da polpa, seguida de secagem em temperatura

ambiente em um recipiente com papel toalha por 24 horas, a fim da retirada do excesso de água. Posteriormente, foi realizada em câmara de fluxo laminar a etapa de assepsia das sementes, com a imersão em álcool etílico 70% por cinco minutos, seguido de uma lavagem de 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2-2,5% de cloro ativo) e, por fim, cinco lavagens em água destilada autoclavada. Após a assepsia, para obtenção de plântulas assépticas, as sementes foram inoculadas em meio de cultura Wood Plant Medium-WPM (Lloyd; Mccown, 1980), pH 5,7-5,8, com 3% de sacarose e gelificado com 4% de agente gelificante substituto de ágar (Phytigel®). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria ( $52 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$  de irradiância).

Os ápices caulinares de mangabeira foram excisados de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*, provenientes do acesso Água Boa (Salvaterra, Ilha do Marajó - Pará) do BAG Mangaba. Os explantes com aproximadamente 1,0-2,0 mm, foram pré-cultivados em diferentes meios, sendo o meio 1 (M1) composto por WPM suplementado com prolina 2,15 mM, sacarose 0,09 M e gelificado com 4% de Phytigel®; o meio 2 (M2) composto por WPM suplementado com prolina 2,15 mM, ácido abscísico  $3,8 \mu\text{M}$  e sacarose 0,09 M e gelificado com 4% de Phytigel® e o meio 3 (M3) composto por WPM suplementado com prolina 2,15 mM, ácido abscísico  $3,8 \mu\text{M}$ , sacarose 0,09 M e gelificado com 4% de Phytigel®. Para o controle, os ápices caulinares foram inoculados em meio de regeneração WPM, suplementado com 3% de sacarose, 1 mg/L de BAP e 4 g/L de Gelrite®. Para o encapsulamento, após o período do pré-cultivo, os ápices caulinares foram imersos por cinco minutos, em 100 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), sem  $\text{Ca}^{+2}$ , acrescido da solução de alginato de sódio 3% (m/v) Sigma-Aldrich A20-33, para a formação das cápsulas. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, foram aspirados e depositados na solução de 100 mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Sigma-Aldrich C10-16, por 20 minutos, sob agitação, para polimerização das cápsulas contendo os meristemas.

Na fase de encapsulamento-vitrificação dos ápices caulinares, as cápsulas foram tratadas com Solução de Carregamento (2,0 M de glicerol + 0,4 M sacarose) por 20 minutos antes da imersão na Solução de Vitrificação para Planta 2 (PVS2), composta por 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose (Sakai et al., 1990)  $4^\circ\text{C}$  a  $0^\circ\text{C}$  para o tempo de exposição de 25 minutos. Após o tratamento com PVS2, as cápsulas foram inseridas em tubos criogênicos de 2,0 mL e mergulhadas em nitrogênio líquido (NL), onde permaneceram por 24 horas. Após a criopreservação, o reaquecimento foi realizado em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  por três minutos. Em seguida, as cápsulas foram tratadas em uma placa de Petri contendo solução de descarregamento (1,2 M sacarose) a  $25^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Posteriormente, as cápsulas foram inoculadas em meio de pós-cultivo, constituído por sais basais do WPM, suplementado com sacarose 0,3 M por 24 horas na ausência de luz. E por fim, inoculadas em meio de regeneração WPM suplementado com  $0,2 \mu\text{M}$  BAP. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria ( $52 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$  de irradiância), a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

As variáveis porcentagens de sobrevivência e regeneração foram tomadas aos 30, 60 e 90 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa estatístico SISVAR (versão 5.6).

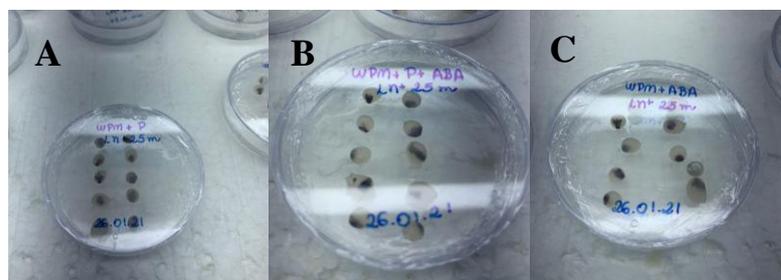
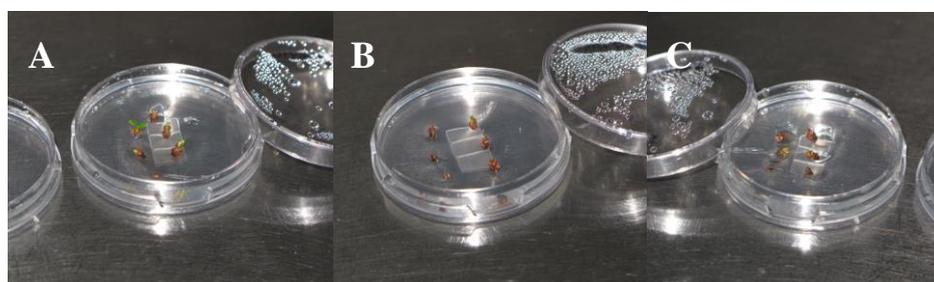
## Resultados e Discussão

Houve efeito significativo dos meios de pré-cultivo na sobrevivência dos meristemas apicais aos 30, 60 e 90 dias (Tabela 1, Figuras 1 e 2). O meio composto por WPM + ABA não obteve sucesso a longo prazo. Entretanto, os meios WPM + prolina e WPM + prolina + ABA, ambos com prolina, apresentaram porcentagens de sobrevivência aos 90 dias de 70 e 60%, respectivamente. De acordo com experimentos de criopreservação de gemas laterais de mangabeira conduzidos por Prudente et al. (2010), as taxas de sobrevivência dos explantes cultivados por 24 horas em meio WPM com 0,1 M de prolina foram de 83,3%. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, comprovando o desempenho da prolina como bioprotetor da membrana celular contra os danos provocados pelas baixas temperaturas da criopreservação.

**Tabela 1.** Porcentagem de sobrevivência de meristemas apicais do acesso de mangabeira Água Boa submetidos a três meios de pré-cultivo e a técnica de encapsulamento-vitrificação aos 30, 60 e 90 dias.

Meios de pré-cultivo	30 dias	60 dias	90 dias
WPM + prolina	100a	90a	70a
WPM + prolina + ABA	100a	60a	60a
WPM + ABA	20b	0b	0b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

**Figura 1.** A - Meristemas encapsulados no meio WPM + prolina; B - meristemas encapsulados no meio WPM + prolina + ABA; C - meristemas encapsulados no meio WPM + ABA.**Figura 2.** Meristemas sobreviventes após o encapsulamento-vitrificação. A - meio WPM + prolina; B - meio WPM + prolina + ABA; C - meio WPM + ABA.

Tratamentos com prolina são notórios por proteger as plantas contra baixas temperaturas e dessecação (Nieves et al., 2001), como demonstrado em um estudo com encapsulados desidratados de embriões somáticos de cana-de-açúcar (Nieves et al., 2001). A alta concentração de sacarose no meio de pré-cultivo reduz a desidratação do explantes. Portanto, é necessário que a aplicação dos crioprotetores, como a prolina, seja feita para que a membrana celular fique estável durante todo o processo e que a célula tenha suas atividades metabólicas normalizadas após o descongelamento (Carpentier et al., 2010). São observadas grandes variações em relação às concentrações necessárias dos agentes crioprotetores a depender da técnica, tipo e espécie da planta utilizada (Nadarajan; Pritchard, 2014).

Os meios 1 (WPM+prolina) e 2 (WPM+prolina+ABA) foram estatisticamente iguais e superiores ao meio 3 (WPM+ABA).

### Conclusões

Os meios de pré-cultivo possuem influência após a técnica de encapsulamento-vitrificação. A presença de prolina nos meios de pré-cultivo M1 e M2 favorecem a sobrevivência dos meristemas apicais após a criopreservação na técnica encapsulamento-vitrificação.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências

- CARPENTIER, S.; VERTOMMEN, A.; SWENNEN, R.; WITTERS, E.; FORTES, C.; SOUZA JUNIOR, M.; PANIS, B. Sugar-Mediated Acclimation: The Importance of Sucrose Metabolism in Meristems. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 5038-46, 2010.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Woody Plant Medium (WPM) - A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. **HortScience**, v. 16, p. 453, 1981.
- MONACHINO, J. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). *Lilloa*, Tucumán, v.11, p. 19-48. 1945.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p.473-497, 1962.
- NADARAJAN, J.; PRITCHARD, H. **Vacuum infiltration vitrification (VIV)-cryopreservation: an innovation in plant conservation**. Conference: Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM . FREEZING BIOLOGICAL TIME: The Royal Botanic Gardens Kew, London, 2014.
- PRUDENTE, D.; PAIVA, R.; NERY, F.; PAIVA, P.; ALVES, J.; MÁXIMO, W.; SILVA, COUTINHO, L. Compatible solutes improve regrowth, ameliorate enzymatic antioxidant systems, and reduce lipid peroxidation of cryopreserved *Hancornia speciosa* Gomes lateral buds. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 4, p. 352-362, 2017.
- SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1995. p. 53-69. (Agriculture, 32).  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-03096-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03096-7_3)