



PAULO AUGUSTO ALMEIDA SANTOS

**CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE
Hancornia speciosa Gomes**

LAVRAS - MG

2013

PAULO AUGUSTO ALMEIDA SANTOS

**CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Hancornia speciosa*
Gomes**

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

Orientador

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Coorientador

Dr. Luciano Coutinho Silva

LAVRAS-MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Paulo Augusto Almeida.

Cultivo e conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes /
Paulo Augusto Almeida Santos. – Lavras : UFLA, 2013.
96 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Mangabeira. 2. Rizogênese *in vitro*. 3. Criopreservação. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.72041

PAULO AUGUSTO ALMEIDA SANTOS

**CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Hancornia speciosa*
Gomes**

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

Aprovada em 02 de julho de 2013

Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto (UFG)

Prof.^a Dr.^a. Ana Hortência Fonsêca Castro (UFSJ)

Prof. Dr. Breno Régis Santos (Unifal)

Dr.^a. Milene Alves de Figueiredo Carvalho (Embrapa Café)

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Orientador

Dr. Luciano Coutinho Silva

Coorientador

LAVRAS - MG

2013

Aos meus pais, José Augusto e Josefina, que graças aos seus esforços permitiram-me realizar meus sonhos.

OFEREÇO

Ao meu irmão, Henrique
Às minhas tias, Genilde e Jacira
À minha namorada, Ane Marcela

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido alcançar esse objetivo profissional em minha vida e por todas as graças que já me proporcionou.

Aos meus pais, José Augusto Oliveira Santos e Josefina de Oliveira Almeida, por todo o incentivo, apoio e amor que sempre tive em toda minha vida.

Ao meu irmão, Henrique Augusto, por todo o incentivo e amizade. Às minhas tias, Jacira e Genilde, que participaram de toda a minha vida ativamente e foram essenciais na minha graduação.

À minha linda namorada Ane Marcela pelo seu amor, companheirismo, paciência e ajuda durante todo o doutorado.

Ao Professor Renato Paiva pela orientação, ensinamentos e confiança que foram essenciais para o desenvolvimento desse estudo e para minha formação.

Aos professores que compõem o Programa de Fisiologia Vegetal pela formação acadêmica e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, especialmente Ana Cristina (Tininha) e Luciano Coutinho, que foram essenciais para a realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas do Programa de Fisiologia Vegetal por todos os ótimos momentos que pude compartilhar com cada um de vocês.

Ao Professor Dr. Carlos Dias da Silva Júnior (UFS) e à Prof^ª Dr^ª Marlúcia Cruz de Santana (UFS) por compartilharem seus conhecimentos e pela amizade, conselhos e orientação.

À Capes pela concessão da bolsas de estudo e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

BIOGRAFIA

Paulo Augusto Almeida Santos, filho de José Augusto Oliveira Santos e Josefina de Oliveira Almeida, nasceu em 07 de novembro de 1985, em Aracaju-SE. Mudou-se para a cidade de Tobias Barreto-SE na mesma semana, onde cursou o 1º e 2º graus na escola Educandário Nossa Senhora do Carmo, finalizando o Ensino Médio, em 2003. Em março de 2004, ingressou no curso de Ciências Biológicas-Bacharelado na Universidade Federal de Sergipe, concluindo o curso em 2007. Em 2008, ingressou no Mestrado em Ecologia e Conservação da Caatinga pela Universidade Federal de Sergipe, o qual concluiu em 2010. Em agosto do mesmo ano, ingressou no Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras-MG, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies nativas do Cerrado, sob a Orientação do Prof. Renato Paiva, PhD. Concluiu o doutorado em 02 de julho de 2013.

RESUMO GERAL

A mangabeira é uma espécie nativa do Brasil que apresenta potencial econômico devido à produção de polpas, sorvetes e doces a partir de seus frutos. Apesar desse potencial, a espécie ainda está em processo de domesticação e as populações naturais vêm sofrendo erosão genética. O cultivo e a conservação *in vitro* por meio da criopreservação são alternativas para a propagação em larga escala bem como a preservação da diversidade vegetal da espécie. O presente estudo teve como objetivos: (i) investigar o cultivo *in vitro* (germinação de embriões zigóticos, enraizamento *in vitro* e aclimatização) e (ii) desenvolver protocolos de criopreservação de ápices caulinares. Para os experimentos de micropropagação, embriões zigóticos de mangabeira foram excisados e desidratados em câmara de fluxo laminar por diferentes tempos e inoculados em meio WPM. Foi investigada a formulação MS e WPM, com 8,87 μM de benzilaminopurina (BAP) para a regeneração de ápices caulinares. No enraizamento *in vitro*, foram avaliados os efeitos de diferentes auxinas AIA, ANA, AIB em diferentes concentrações. Na aclimatização foram avaliados diferentes substratos. Para a criopreservação, foram testados diferentes tempos de imersão em uma solução de carregamento rica em sacarose, seguida ou não pela imersão em PVS2. Os ápices caulinares foram pré-cultivados ou não em meio WPM com 0,3 M de sacarose por 0, 24 e 48 horas foram imersos em PVS2 a 0 °C, por diferentes períodos antes da imersão em nitrogênio líquido. Foi observado que embriões zigóticos de mangabeira perdem a viabilidade com o aumento do período de desidratação. O emprego de 9,84 μM das auxinas avaliadas promoveu um maior desenvolvimento em termos de massa das raízes. A aclimatização pode ser realizada com sucesso, independente dos substratos utilizados. Os experimentos de criopreservação demonstraram que 20 minutos de tratamento em solução de carregamento com a posterior imersão em PVS2 permitiu a criopreservação dos ápices. Ambas as técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação permitiram a criopreservação de ápices caulinares de mangabeira. Foi observado que o tempo de 24 horas de pré-cultivo dos ápices permitiu uma maior porcentagem de retomada de crescimento após a criopreservação. O meio WPM acrescido de 3,33 μM de BAP, 0,27 μM de ANA permite uma maior retomada de crescimento dos ápices após a criopreservação.

Palavras-chave: Mangabeira. Espécie nativa. Rizogênese *in vitro*. Conservação *in vitro*. Criopreservação.

GENERAL ABSTRACT

The mangaba tree is a native species from Brazil which presents economic potential due to the production of pulp, ice cream and sweets from its fruits. Despite this potential, the species is still in a domestication process and natural populations have suffered genetic erosion. Plant tissue culture and *in vitro* conservation through cryopreservation are alternatives to the large-scale propagation and conservation of plant diversity. The present study aimed to investigate the *in vitro* culture (zygotic embryos germination, *in vitro* rooting and acclimatization) and to develop protocols for shoot tip cryopreservation. For the micropropagation studies, zygotic embryos were excised and dried in a laminar flow for different times and inoculated in WPM. For shoot tips regeneration, the media MS and WPM containing 8.87 μM benzylaminopurine (BAP) were investigated. The effects of different auxins (IAA, NAA and IBA) and concentrations during the *in vitro* rooting were evaluated. The acclimatization was evaluated using different substrates. For cryopreservation, shoot tips were treated for different periods in a loading solution rich in sucrose, followed by immersion in PVS2. Shoot tips were precultured or not in WPM medium with 0.3 M sucrose for 0, 24 and 48 hours prior treatment in PVS2 at 0° C for different periods before plunge into liquid nitrogen. It was observed that zygotic embryos lose their viability increasing the dehydration period. Synthetic seeds composed by WPM or MS ensure high survival of explants. Growing shoot tips was favored by using the MS medium supplemented with 8.87 μM BAP. The use of 9.84 μM auxin promoted the development in terms of root mass. Acclimatization can be successfully performed, independent of the substrate. The cryopreservation experiments demonstrated that the use of 20 minutes of loading solution with subsequent treatment in PVS2 allowed the shoot tip cryopreservation. Both techniques, vitrification and droplet vitrification, allowed shoot tip cryopreservation. The period of 24 hours of shoot tip pre-culture promoted a higher regrowth percentage following cryopreservation. The use of WPM containing 3.33 μM BAP + 0.27 μM NAA allowed promoted the regrowth of cryopreserved shoot tips.

Keywords: Mangaba tree. Native species. *In vitro* rooting. *In vitro* conservation. Cryopreservation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Mangabeira.....	12
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	14
2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de mangabeira.....	16
2.3 Conservação <i>in vitro</i>	17
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	30
Cultivo <i>in vitro</i> : germinação de embriões zigóticos, produção de unidades encapsuláveis, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Meio de cultivo para ápices caulinares.....	35
2.2 Unidades encapsuláveis.....	36
2.3 Germinação e criopreservação de embriões zigóticos	37
2.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de mangabeira.....	38
2.5 Aclimatização	39
2.6 Análises estatísticas.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Meio de crescimento para ápices caulinares	41
3.2 Unidades encapsuláveis.....	43
3.3 Germinação e crioprervação de embriões zigóticos.....	44
3.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de mangabeira.....	50
3.5 Aclimatização de brotações de mangabeira enraizadas <i>in vitro</i>	55
3.6 Teor de clorofila de brotações aclimatizadas	56
4. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 3	63

CRIOPRESERVAÇÃO DE MANGABEIRA	63
RESUMO	64
1 INTRODUÇÃO.....	67
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 Material vegetal.....	69
2.2. Efeito da solução de carregamento na criopreservação de ápices de mangabeira	70
2.3 Comparação entre as técnicas de <i>droplet vitrification</i> e vitrificação .	71
2.3.1 <i>Droplet Vitrification</i>	71
2.3.1.1 Pré-cultivo em alta concentração de sacarose	71
2.3.2 Vitrificação.....	72
2.4 Pós-descongelamento	72
2.5 Teste de meio de retomada de crescimento de ápices após a criopreservação.....	73
2.5 Delineamento experimental.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Efeito da solução de carregamento na criopreservação de ápices.....	74
3.2 Comparação entre as técnicas de <i>droplet vitrification</i> e vitrificação .	76
3.2.1 <i>Droplet vitrification</i> sem pré-cultivo dos ápices caulinares.....	76
3.2.2 <i>Droplet vitrification</i> com pré-cultivo dos ápices caulinares	78
3.2.3 Vitrificação.....	82
3.3 Efeito do meio de cultivo na etapa pós-descongelamento	85
4 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos principais biomas brasileiros e abrangia cerca de 24% do território nacional. O bioma apresenta uma elevada biodiversidade vegetal, com cerca de 7.000 espécies, dessas 44% são consideradas endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005). Apesar dessa grande riqueza de recursos genéticos, as áreas de ocorrência naturais estão sendo suprimidas para a implantação de atividades agrícolas.

A expansão da agricultura é propiciada pelas condições climáticas favoráveis (GALHARTE; CRESTANA, 2010), além dos recentes avanços tecnológicos no manejo dos solos e das culturas (BATLE-BAYER; BATJES; BINDRABAN, 2010). Essas alterações ambientais trazem consequências como a fragmentação das áreas e erosão genética de espécies nativas. Apesar disso, iniciativas para a conservação *in situ* como a criação de unidades de conservação, como parques, reservas e estações ecológicas, abrangem menos de cinco por cento da área original do Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005).

Para a manutenção de diversas espécies do Cerrado, a conservação *ex situ*, por meio de bancos de sementes, criobancos e bancos de germoplasma em campo poderiam ser adotados. Entretanto, essa última forma de conservação está suscetível a desastres naturais e ocorrência de pragas e doenças que podem dizimar uma coleção inteira, repentinamente (RAI et al., 2009).

Outras limitações dos bancos de germoplasma em campo estão relacionadas à limitada abrangência da diversidade genética que pode ser conservada devido à necessidade de grandes áreas e o alto custo de manutenção (DULLOO et al., 2009). Essas estratégias de conservação *ex situ* são consideradas complementares à conservação *in situ* e servem para assegurar a conservação de espécies ameaçadas ou que estão sofrendo erosão genética (ENGELMANN, 2011; VOLIS; BLECHER, 2010).

Entre as espécies que sofrem com a erosão genética destaca-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). A mangabeira é uma árvore frutífera nativa do Brasil, cuja área de ocorrência abrange partes do Norte e Nordeste, vegetando também no Cerrado (ANDERSEN; ANDERSEN, 1998; PINHEIRO et al., 2001). Nesse bioma, devido aos impactos ocasionados por desflorestamento, introdução de pastagens, fogo e fragmentação das áreas, diversas espécies têm a sua sobrevivência ameaçada (DURIGAN; SIQUEIRA; FRANCO, 2007), incluindo a mangabeira.

A mangabeira possui um grande potencial econômico devido às diversas possibilidades de aproveitamento de seus frutos, seja para o consumo *in natura*, produção de sucos, doces, sorvetes e compotas (SOARES et al., 2011). Apesar da grande demanda por frutos, a produção é basicamente extrativista, não sendo, portanto, suficiente para atender à indústria de processamento de frutos, limitando a conquista de novos mercados (BESSA et al., 2012).

Esta característica de produção também confere à mangabeira uma importância social para as famílias da região Norte de Minas Gerais e do Nordeste, pois a coleta dos seus frutos, além de contribuir para a segurança alimentar, é fonte de renda para essas famílias (LIMA et al., 2012). Porém, essa atividade também proporciona um impacto sobre as populações naturais da espécie.

Uma das formas de reduzir a pressão antrópica que a mangabeira sofre seria por meio da implantação de plantios comerciais. Dentre os problemas para a implantação destaca-se o fato das sementes serem recalcitrantes (PINHEIRO et al., 2001). As sementes recalcitrantes não podem ser armazenadas por longos períodos, pois não toleram a desidratação necessária para serem armazenadas em baixas temperaturas (ENGELMANN, 2011). Nesses casos, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos permite superar a dificuldade da propagação por via sexuada, através da micropropagação (PINHAL et al., 2011).

A cultura de tecidos pode ainda auxiliar na conservação de material genético por meio da conservação *in vitro*. A conservação *in vitro* consiste em manter o material *in vitro* seja por meio do crescimento lento ou através da criopreservação. Essa última técnica consiste na conservação de material em nitrogênio líquido a -196°C , sendo que essas condições garantem a conservação a longo prazo (REED et al., 2011).

A criopreservação é um método seguro que permite a repetibilidade dos protocolos e possibilidade de armazenamento por períodos indeterminados sem qualquer alteração nos materiais armazenados (CHEN et al., 2011).

Objetivou-se, neste trabalho, estudar diferentes etapas do cultivo *in vitro* de mangabeira e a eficácia de diferentes técnicas de criopreservação, visando à conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mangabeira

Hancornia speciosa Gomes é uma espécie pertencente à família Apocynaceae e à classe Dicotyledoneae. O gênero do qual faz parte apresenta seis variedades botânicas *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani*, *H. speciosa* var. *cuyabensis*, *H. speciosa* var. *lundii*, *H. speciosa* var. *gardineri* e *H. speciosa* var. *pubescens* (GANGA et al., 2010).

A mangabeira é uma árvore que pode atingir dez metros de altura, apresenta casca com coloração escura, fendilhada ou íntegra. As folhas são opostas e pecioladas, oblongas, coriáceas e glabras. A inflorescência localiza-se no ápice dos ramos, com duas a cinco flores hermafroditas, ocasionalmente flores isoladas. As flores são brancas e aromáticas com três a quatro centímetros de comprimento (VIEIRA NETO et al., 2009).

O fruto da mangabeira é uma baga elipsóide, carnosa, de coloração amarela esverdeada, diâmetro médio de 3,4 cm e comprimento médio de 3,7 cm (GANGA et al., 2010), com peso variando entre 15 g a 102,8 g (SALOMÃO; SANTOS; MUNDIM, 2004). O suco é viscoso, a polpa é branca, acidulada, perfumada e saborosa (VIEIRA NETO et al., 2009). As sementes apresentam formato discóides, sendo achatadas e com sete a oito milímetros de diâmetro, coloração castanho-clara, rugosas e com hilo central (GOMES, 2007), apresenta de duas a 15 sementes por fruto (SOUSA et al., 2005).

No Brasil, a mangabeira apresenta uma ampla distribuição geográfica, desde o estado do Amapá até o estado de São Paulo. Plantas nativas são encontradas vegetando em áreas com solos arenosos, ácidos, pobres em nutrientes e em matéria orgânica, típicos das regiões de cerrado e baixadas

litorâneas. Com relação ao Cerrado, a mangabeira ocorre principalmente em encostas pedregosas (MACHADO et al., 2004) e segundo Ganga et al. (2010), nas fisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito e campo sujo ou campo rupestre.

Nas áreas litorâneas, devido às pressões antrópicas, o germoplasma dessa espécie está ameaçado, mas ainda não existem registros da presença da mangabeira em nenhuma lista de espécies em extinção (VIEIRA NETO et al., 2009). No Cerrado, a expansão da agricultura, o manejo inadequado dessas áreas, o desmatamento e o extrativismo predatório ocasiona grandes danos a esse bioma (MACHADO et al., 2004; PINHAL et al., 2011) e conseqüentemente, às populações de mangabeira.

A degradação das áreas naturais de ocorrência compromete a produção de frutos, pois a maior parte da produção de mangaba é oriunda do extrativismo (MOTA; SANTOS, 2008). Essa dependência da coleta extrativista deve-se ao fato de que a espécie ainda está em fase de domesticação e não existem plantios racionais e tecnificados em escala comercial (SOARES et al., 2009).

Atualmente, as famílias que realizam o extrativismo comercializam os frutos em feiras livres ou, principalmente, esses são destinados às centrais de abastecimento (CEASAS), grandes redes de supermercados e indústrias de processamento de polpa, porém, a demanda por parte das indústrias é maior que a oferta atual (VIEIRA NETO et al., 2009). Os frutos podem ser aproveitados para a produção de sorvetes, refrescos, compotas, doces e xaropes (GOMES, 2007).

A propagação de *Hancornia speciosa*, na maioria dos casos, é realizada pela via sexuada, devendo as sementes ser extraídas de frutos maduros e ter a polpa retirada por meio de lavagem com água, pois essa impede a germinação (BARROS, 2006).

Além da propagação, por ser uma cultura ainda em fase de domesticação, diversos aspectos necessitam de maiores estudos, entre esses fatores pode-se destacar a propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais. Assim o desenvolvimento de tecnologias de propagação *in vitro* também são de grande importância para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento (LEDO et al., 2007).

2.2 Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos é uma técnica aplicada com diversas finalidades, sendo a propagação vegetativa *in vitro* realizada a partir de pequenos fragmentos de uma planta, também denominada de micropropagação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), a de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Essa forma de propagação pode minimizar ou resolver dificuldades com relação à multiplicação sistematizada de plantas frutíferas do Cerrado, pois algumas espécies nativas apresentam dificuldade na propagação seminífera (MACHADO et al., 2011; PINHAL et al., 2011).

Outra dificuldade para a propagação de espécies nativas é a ocorrência de heterogeneidade na maturação dos frutos e a presença de algum tipo de dormência das sementes (COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010), o que geralmente compromete a germinação e produção de mudas em escala comercial. Com isso, a cultura de tecidos é uma alternativa para a produção de mudas uniformes a qualquer época do ano, com isenção de pragas e doenças, além de permitir o intercâmbio de material genético, resgate de germoplasma e preservação de material genético ameaçado (PINHAL et al., 2011).

Estas diversas aplicações são possíveis, pois a micropropagação compreende diversas etapas, desde o estabelecimento inicial do explante *in vitro*, a multiplicação, a rizogênese até à aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007). A rizogênese, ou a formação de raízes adventícias, é uma das etapas primordiais na propagação vegetativa e nessa fase podem ocorrer perdas motivadas por explantes que não formaram raízes ou formaram raízes pouco desenvolvidas (KLERK; KRIKEN; JONG, 1999; LIU; GILDING; GODWIN, 2013).

O enraizamento *in vitro* depende da interação de muitos fatores fisiológicos, bioquímicos e ambientais, além da variação genotípica. Para o início da rizogênese existe uma relação quantitativa entre os níveis de auxinas e citocininas endógenas (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; FERREIRA et al., 2011). As auxinas são geralmente apontadas como a classe de fitorreguladores capazes de promover uma acentuada formação de primórdios radiculares, porém as resposta às auxinas não são universais (KLERK; KRIKEN; JONG, 1999) e a combinação de fitorreguladores pertencente à classes de auxinas também alteram o número e o desenvolvimento de primórdios radiculares (LIU; GILDING; GODWIN, 2013). As auxinas mais empregadas para o enraizamento *in vitro* são: o ácido indol-acético (AIA), o ácido 3-indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

O enraizamento pode ser dividido em três etapas, sendo a primeira denominada de desdiferenciação, na qual as células tornam-se competentes para a resposta rizogênica à auxina. A indução é a fase seguinte e nesse estágio algumas células, pela ação da auxina, tornam-se determinadas para a formação de raízes. O último estágio é o da diferenciação em que não é mais necessário nenhum sinal e as células produzem o primórdio radicular no qual irá se desenvolver a raiz adventícia (KLERK, 2002).

Após o processo de enraizamento, a nova etapa, que deve ser superada, é a fase de aclimatização. Essa fase consiste na retirada da plântula da condição *in vitro* para a condição *ex vitro*, ou seja, a transferência da sala de crescimento para a casa-de-vegetação (MOREIRA et al., 2006) e, posteriormente, para o campo. A aclimatização é uma etapa delicada, pois as plântulas oriundas do cultivo *in vitro* são sensíveis à desidratação e tenras. Isso se deve ao não desenvolvimento de uma cutícula espessa- o que permite uma alta taxa de transpiração cuticular- além disso, as paredes celulares não apresentam a rigidez necessária para a sustentação da nova planta. As folhas de plântulas cultivadas *in vitro* são delgadas e apresentam uma taxa fotossintética muito baixa, além de possuírem estômatos não funcionais. Essas características são fonte de estresse logo após o transplântio (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003).

A escolha do substrato é outro ponto que deve ser observado na aclimatização de plântulas propagadas *in vitro*. O substrato pode influenciar o crescimento e desenvolvimento das plantas. Dessa forma, a escolha de um bom suporte inicial é essencial para o sucesso da aclimatização (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003) pois ele influencia a qualidade das raízes que são formadas (HOFFMANN et al., 2001). Além disso, esses devem fornecer os elementos mineirais essenciais ao crescimento (BESSA et al., 2012).

2.2.1 Cultivo *in vitro* de mangabeira

Apesar da grande potencialidade de aplicações da cultura de tecidos, somente a partir do ano 2000 intensificaram-se os estudos de propagação *in vitro* para a mangabeira. Esses trabalhos fornecem subsídios relevantes para programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos (LÉDO et al., 2007).

A germinação de sementes de mangabeira em meio de cultura foi estudada por diversos pesquisadores (LÉDO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2001; SOARES et al., 2009), sendo obtidos altos índices de germinação utilizando os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Com relação à indução de brotações em mangabeira a partir de segmentos nodais, Soares et al. (2007) estudaram o efeito do BAP e determinaram que o acréscimo de 8,87 μM desse regulador promove a formação de brotações mais desenvolvidas. No mesmo estudo, os autores avaliaram a efetividade do emprego de ANA e AIB no enraizamento *in vitro*. Entretanto, o enraizamento não foi obtido com o emprego da primeira e apenas uma porcentagem reduzida de explantes enraizados foi obtido quando aplicada a segunda fonte de auxina, porém, os autores afirmaram que essa baixa taxa pode ser devido a efeitos residuais de BAP. Esse efeito residual foi comprovado por Soares et al. (2011), tendo-se verificado que explantes cultivados em meio WPM basal tinham maior porcentagem de formação de raízes, quando se adicionou AIB ao meio. Nesse mesmo estudo os autores relataram que o efeito residual do BAP persiste até, pelo menos, três subcultivos.

2.3 Conservação *in vitro*

A conservação *in vitro* consiste na manutenção de material biológico em condições assépticas. Entre as formas de conservação *in vitro* pode-se empregar o crescimento lento ou a criopreservação. O crescimento lento é uma técnica de conservação a médio prazo e consiste na alteração da constituição do meio de cultura e ou do ambiente, como a redução da temperatura e da intensidade

luminosa. Essas alterações reduzem a taxa de crescimento dos explantes e os subcultivos podem ter intervalos maiores (ENGELMANN, 2011).

A criopreservação é uma forma de conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C ou em sua fase de vapor a -150°C . Essa baixa temperatura não permite a ocorrência de reações metabólicas dirigidas termicamente, garantindo a viabilidade do armazenamento do material biológico sem que esse sofra modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (SANTOS, 2004). Apenas reações fotofísicas podem ocorrer nessas condições, como quebra de macromoléculas e formação de radicais livres, porém somente se submetidas à radiações ionizantes (MAZUR, 1984).

A criopreservação pode ser aplicada para a conservação de diferentes tipos de explantes, dentre os quais pode-se citar: protoplastos, suspensões celulares, calos embriogênicos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões zigóticos e somáticos (BENSON, 2008). As coleções são mantidas em pequenos espaços, permanecem protegidas de contaminação e requerem uma pequena manutenção (ENGELMANN, 2004). Além disso, o custo do armazenamento em um banco criogênico requer um aporte financeiro menor ao longo dos anos comparado a outros sistemas disponíveis de conservação de material genético, como bancos de germoplasma em campo e a conservação *in vitro* por meio de crescimento lento (DULLOO et al., 2009; ENGELMANN, 2004; SANTOS, 2004).

Para o sucesso na criopreservação é essencial evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, sendo a temperatura entre -15 a -60°C crítica, pois é a faixa em que ocorre a nucleação e formação de cristais de gelo. Além disso, o explante é submetido duas vezes a essas faixas de temperatura, a primeira durante o resfriamento e a segunda durante o descongelamento (MAZUR, 1984).

A formação de cristais de gelo provoca danos nos sistemas de membranas comprometendo a semipermeabilidade. Materiais como suspensões celulares, calos, ápices caulinares e embriões apresentam altos conteúdos de água na célula e são passíveis de formação de cristais de gelo (ENGELMANN, 2011). Além disso, o congelamento e o reaquecimento pode levar à desnaturação de enzimas (ARAKAWA et al., 1990) o que pode tornar inviável a retomada do metabolismo do organismo.

A prevenção da formação de cristais de gelo pode ser obtida pela vitrificação, por meio de um congelamento rápido. A vitrificação é definida como a transição direta da água no estado líquido para um estado amorfo ou vítreo (ENGELMANN, 2011) ou, em outras palavras é a solidificação de líquidos sem a cristalização. Esse processo é dependente do incremento da viscosidade da solução que ocorre quando os solutos tornam-se mais concentrados (SANTOS, 2000).

O aumento da viscosidade reduz a formação de cristais de gelo, porém o estado de vitrificação é instável, principalmente durante o descongelamento. Nessa etapa, pode haver formação de grandes cristais de gelo quando este começa a passar do estado vitrificado para o estado líquido. Pequenos cristais de gelo presentes no estado vitrificado podem, durante o descongelamento, agregar-se e formar cristais maiores que levarão à ocorrência de danos celulares (MAZUR, 1984). Para evitar a recristalização, o material deve ser retirado do nitrogênio líquido e rapidamente descongelado (BENSON, 2008).

O estado vítreo pode ser favorecido pelo uso de soluções de vitrificação ou pelo emprego de técnicas de desidratação (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). Obtém-se o estado de vitrificação pelo congelamento rápido em nitrogênio líquido. Para tanto é necessário que a solução celular esteja muito concentrada para evitar injúrias letais durante o congelamento. Já a desidratação pode ser obtida em câmara de fluxo, por congelamento lento, pela aplicação de

substâncias crioprotetoras penetrantes ou não, ou ainda, pela utilização das técnicas em conjunto (PANIS; SWENNEN, 2005).

As substâncias crioprotetoras devem ter a capacidade de penetrar nas células e, ao mesmo tempo, apresentar reduzida toxicidade nas concentrações e períodos de exposição requeridos para a sua eficácia. A penetração dessas substâncias contribui para uma maior osmolaridade do sistema. Entre as substâncias empregadas normalmente para este fim estão: a sacarose, o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol (BENSON, 2008). A sacarose também é muito utilizada na fase de pré-cultivo dos explantes (SHATNAWI; JOHSON, 2004), ou seja, antes de submeter o material à imersão em nitrogênio líquido. Tanto a concentração quanto o tempo de exposição dos explantes a sacarose devem ser otimizadas para cada espécie.

Os crioprotetores podem ser agrupados em três categorias: penetrantes à parede celular e membrana plasmática (glicerol, etilenoglicol e DMSO), penetrantes à parede celular (aminoácidos como prolina, oligossacarídeos como sacarose e manitol, e polímeros com baixo peso molecular como PEG1000), e não penetrantes (proteínas solúveis, polissacarídeos, mucilagem) (TAO; LI, 1986). Atualmente, diversas soluções de vitrificação têm sido desenvolvidas, sendo as mais amplamente empregadas as baseadas no emprego de glicerol como a *plant vitrification solution* - PVS2 [30% glicerol (p/v), 15% etilenoglicol (p/v), 15% DMSO (p/v), 0,4M sacarose no meio basal de cultura] e PVS3 (40% glicerol, 40% sacarose no meio basal de cultura] (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Entre as técnicas que envolvem o emprego da solução PVS2, a técnica de *droplet vitrification* é uma das mais recentes e consiste no pré-tratamento de ápices caulinares em meios com diferentes concentrações de sacarose. Em seguida, ocorre um tratamento prévio em solução de carregamento [2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose dissolvido em meio Murashige e Skoog (1962)] e

depois a imersão em solução PVS2. Então, os ápices caulinares são colocados em uma folha de papel alumínio com uma gota de PVS2 e, rapidamente, congeladas em nitrogênio líquido. O descongelamento é realizado à temperatura ambiente e empregando-se uma solução de diluição rica em sacarose (CHEN et al., 2011; ENGELMANN, 2011). Após o descongelamento, os ápices caulinares são inoculados em meio específico e a retomada do crescimento avaliada após três ou quatro semanas.

Apesar das técnicas atuais e dos diferentes protocolos descritos na literatura, o sucesso da utilização da criopreservação para novas espécies ainda depende da otimização de cada passo sucessivo (DUSSERT; ENGELMANN; NOIROT, 2003).

Para a mangabeira algumas etapas já foram estudadas previamente, como a produção de unidades encapsuláveis, também denominada de sementes sintéticas. Esse é um dos primeiros passos para a criopreservação pela técnica de encapsulamento desidratação e encapsulamento vitrificação.

A constituição das unidades encapsuláveis de mangabeira e o meio de conversão utilizando-se como explante segmentos caulinares foram avaliados por Nogueira (2010), no qual foi obtido 90% de sobrevivência dos ápices inoculados em meio de cultura WPM, contendo metade da concentração de sais e suplementado com 8,87 μ M BAP, enquanto na constituição da matriz da cápsula de alginato foi empregado o meio WPM. A mesma autora observou que essas cápsulas após serem submetidas à imersão em nitrogênio líquido, os explantes contidos nela não sobreviveram, porém nesse estudo foi possível a conservação dessas unidades encapsuláveis, em geladeira, por curto período.

Silva (2010) estudando a criopreservação de embriões de mangabeira não obteve sucesso com o emprego da técnica de vitrificação utilizando a solução de DMSO nas concentrações de 0, 5, 10 e 15%. Mesmo os embriões que não foram imersos em nitrogênio líquido, apresentaram uma forte redução na

porcentagem de germinação quando a concentração de DMSO foi superior a cinco por cento.

Atualmente, existem somente protocolos de conservação *in vitro* da mangabeira baseados em crescimento lento (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011; SANTOS et al., 2011), mas essas técnicas necessitam de repicagens com uma certa periodicidade o que expõe ao risco de contaminação e, conseqüentemente, à perda do material. Dessa forma, pode-se notar que existe uma carência de técnicas de conservação *in vitro* a longo prazo, como a criopreservação, para a mangabeira.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 150 p.
- ARAKAWA, T. et al. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, n. 4, p. 401-415, Aug. 1990.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 261-296.
- BARROS, D. I. **Tecnologia de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 1122-1124, jul. 2007.
- BATTLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; BINDRABAN, P. S. Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: a review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Wageningen, v. 137, n. 1, p. 47-58, Mar. 2010.
- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 15-32.
- BESSA, L. A. et al. Characterization of the effects of macronutrient deficiencies in mangabeira seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1235-1244, dez. 2012.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, maio 2010.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeitos de diferentes substrates durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cesarifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 125-128, abr./jun. 2003.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, Nov./Dec. 2009.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C. Threats to the cerrado remnants of the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 355-363, jul./ago. 2007.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F.; NOIROT, M. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. **Cryo-Letters**, London, v. 24, n. 3, p. 149-160, May/June 2003.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, Nov. 2011.

FERREIRA, J. P. et al. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 563-566, abr./jun. 2011.

GALHARTE, C. A.; CRESTANA, S. Avaliação do impacto ambiental da integração lavoura-pecuária: aspecto conservação ambiental no cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p. 1202-1209, ago. 2010.

GANGA, R. M. D. et al. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 101-113, mar. 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 520 p.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 2007. 446 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘marubakaido’. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 462-467, ago. 2001.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, n. 5, p. 415-422, Sept./Oct. 2002.

KLERK, G. J. de; KRIKEN, W. V. der; JONG, J. C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 35, n. 3, p. 189-199, May/June 1999.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

LÉDO, A. S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, jul./ago. 2007.

LIMA, I. L. P. et al. Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 26, n. 3, p. 675-684, jul./set. 2012.

LIU, G.; GILDING, E. K.; GODWIN, I. D. Additive effects of three auxins and copper on sorghum *in vitro* root induction. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 49, n. 2, p. 191-197, Apr. 2013.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, May/June 1980.

MACHADO, L. L. et al. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 431-435, maio 2004.

MACHADO, M. P. et al. Enraizamento de microestacas de *Lavandula angustifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 767-772, maio 2011.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3, p. 125-142, Sept. 1984.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out. 2006.

MOTA, D. M.; SANTOS, J. V. Uso e conservação dos remanescentes de mangabeira por populações extrativistas em Barra dos Coqueiros, Estado de Sergipe. **Acta Scientiarum Human and Social Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 173-180, jul. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

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

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 45-55, Aug. 2005.

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

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

RAI, M. et al. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, Apr. 2009.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 1-4, July/Aug. 2011.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, jan. 2011.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. **Cryo-Letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 33-58.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Criopreservação de nucellar of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, Jan. 1990.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; MUNDIM, R. C. **Conservação, manejo e uso de sementes de *Hancornia speciosa* Gomez (Apocynaceae)**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 26 p. (Documentos, 126).

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. (EMBRAPA-CENARGEN: Documentos, 115).

_____. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 70-94, jul. 2000.

SANTOS, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul./set. 2011.

SHATNAWI, M. A.; JOHNSON, A. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of 'christmas bush' (*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 2, p. 239-244, Mar./Apr. 2004.

SILVA, E. O. **Propagação e armazenamento de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009. Número especial.

_____. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

_____. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev. 2011.

SOUSA, C. S. et al. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 29-31, set. 2005.

TAO, D.; LI, P. H. Classification of plant cell cryoprotectants. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 123, n. 1, p. 305-310, 1986.

VIEIRA NETO, R. D. et al. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009. 338 p.

VOLIS, S.; BLECHER, M. Quasi in situ: a bridge between ex situ and in situ conservation of plants. **Biodiversity Conservation**, Dordrecht, v. 19, n. 9, p. 2441-2454, Aug. 2010.

CAPÍTULO 2

Cultivo *in vitro*: germinação de embriões zigóticos, produção de unidades encapsuláveis, enraizamento *in vitro* e aclimatização

RESUMO

O cultivo *in vitro* é uma técnica que pode ser empregada para diversas finalidades desde a multiplicação de material em larga escala, em condições assépticas, até a conservação e intercâmbio de material genético entre instituições de pesquisa. Para a mangabeira, uma espécie nativa do Brasil e que possui grande potencial econômico, as pesquisas relacionadas à multiplicação *in vitro* ainda necessitam de estudos mais aprofundados em algumas etapas da micropropagação. Objetivou-se avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos, a produção de unidades encapsuláveis, o meio de cultivo para ápices caulinares, o efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina no enraizamento *in vitro* e diferentes substratos na fase de aclimatização, assim aprimorando a micropropagação para a espécie. Embriões zigóticos de mangabeira foram excisados e desidratados em câmara de fluxo laminar por diferentes tempos (20, 60, 100 e 120 minutos) e inoculados em meio WPM. Foi investigada a constituição da cápsula de alginato suplementada com diferentes formulações de sais (WPM ou MS) para a produção de unidades encapsuláveis utilizando ápices de mangabeira (0,5 – 1 mm). Para o meio de cultivo para ápices caulinares foi investigada a formulação MS e WPM, ambas acrescidas de 8,87 μM de 6-benzilaminopurina (BAP). No enraizamento *in vitro* foram avaliados os efeitos de diferentes auxinas (AIA, ANA, AIB) em diferentes concentrações (0; 2,46; 4,92; 9,84 e 19,68 μM). Na aclimatização foram avaliados diferentes substratos (vermiculita, Multiplant[®], e uma mistura de vermiculita e Multiplant[®] 1:1). A excisão de embriões de mangabeira é viável para a germinação *in vitro*, mas períodos de desidratação de 120 minutos reduzem a sobrevivência. Quanto às unidades encapsuláveis a constituição da cápsula com o meio WPM ou MS garantiram elevada sobrevivência. Os ápices caulinares apresentaram maior crescimento quando cultivados em meio MS acrescido de 8,87 μM de BAP. O emprego de 9,84 μM das auxinas avaliadas promoveu um maior desenvolvimento em termos de massa das raízes. A aclimatização pode ser realizada com sucesso, utilizando-se como substrato a vermiculita, substrato comercial-Multiplant[®] e a mistura 1:1 dos substratos anteriores.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*. Rizogênese *in vitro*. Embriões zigóticos. Unidades encapsuláveis.

ABSTRACT

The *in vitro* culture is a technique that can be employed for various purposes, since aseptically large scale multiplication to the conservation and exchange of genetic material between research institutions. For mangaba tree, a native species from Brazil which presents economic potential, the research related to the *in vitro* multiplication still require further studies in some micropropagation steps. Thus, the aim of this study was to evaluate different techniques such as *in vitro* germination of zygotic embryos, production of synthetic seeds, evaluate the shoot tip regeneration medium, the effect of different types and auxin concentrations *in vitro* rooting and to evaluate different substrates during the acclimatization phase. Zygotic embryos of mangaba tree were excised and dried in a laminar flow bench for different periods (20, 60, 100 and 120 minutes) and inoculated in WPM medium. The capsule composition (WPM or MS salts) for producing synthetic seed using shoot tips as explants were evaluated. The MS and WPM media, both supplemented with 8,87 μM 6-benzylaminopurine (BAP) for the shoot tips regeneration were investigated. The effect of different auxins (IAA, NAA, IBA) at different concentrations (0, 2.46, 4.92, 9.84 and 19.68 μM) during *in vitro* rooting was evaluated. The acclimatization was performed using different substrates (vermiculite, Multiplant[®], vermiculite and a mixture of vermiculite and Multiplant[®] 1:1). Excision of embryos is feasible for germination *in vitro*, but 120 minutes dehydration reduces the embryo survival. Regarding the capsule composition, the use of WPM or MS media ensured high survival of synthetic seeds. The shoot tips showed higher growth when cultured on MS medium supplemented with 8,87 μM BAP. The use of 9.84 μM auxin promoted the higher development in terms of roots mass. Acclimatization can be successfully carried independent of the substrate.

Keywords: *Hancornia speciosa*. *In vitro* rooting. Zygotic embryos. Synthetic seeds.

1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta importante para a compreensão de eventos biológicos, como a formação de raízes, efeito de reguladores de crescimento na fisiologia do vegetal e desenvolvimento de embriões. Além disso, pode ser utilizada em programas de melhoramento genético, principalmente, na propagação massal de cultivares (MOYO; STADEN, 2013), bem como para a conservação de material genético (BHATTI; JHA, 2010).

Entre as técnicas envolvidas na cultura de tecidos vegetais, a micropropagação pode ser definida como uma forma de propagação vegetativa *in vitro*, utilizando-se pequenos explantes. Essa técnica geralmente envolve quatro etapas distintas: o estabelecimento do explante, multiplicação de brotações, enraizamento *in vitro* e aclimatização (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

A micropropagação também pode ser utilizada para espécies que apresentam dificuldades na propagação sexuada e vegetativa convencional, como é o caso da mangabeira. Essa espécie nativa do Cerrado apresenta sementes recalcitrantes (PINHEIRO et al., 2001) e a propagação por estaquia é pouco difundida devido à falta de estudos (SOARES et al., 2006).

Com relação ao cultivo *in vitro* da mangabeira algumas etapas já foram investigadas, entre as quais: a germinação *in vitro* (LÉDO et al., 2007; MACHADO et al., 2004; PINHEIRO et al., 2001; SOARES et al., 2009), a excisão e germinação de embriões zigóticos (FREIRE et al., 2011), calogênese (FRÁGUAS; VILLA; LIMA, 2009), indução de brotações (MACHADO et al., 2004; SOARES et al., 2007, 2011), crescimento lento (SÁ; LÉDO; LÉDO,

2011; SANTOS et al., 2011), efeito de diferentes vedações e tipos de explantes na micropropagação (SÁ et al., 2012).

De acordo com Lédo et al. (2007), a germinação *in vitro* é a forma mais comum de estabelecimento de material e apresenta como vantagens explantes mais viáveis e mais responsivos. Entretanto, outros explantes também podem ser utilizados para o estabelecimento da cultura, como segmentos foliares, caulinares e embriões zigóticos. Esses últimos podem ser empregados para o estudo de aspectos fisiológicos do desenvolvimento inicial da planta (HU; FERREIRA, 1998). Para a mangabeira, a germinação de embriões zigóticos foi realizada por Freire et al. (2011), mas não existem na literatura estudos relacionados à dessecação dos embriões por períodos curtos antes da sua inoculação *in vitro*.

A cultura de tecidos também permite a produção de unidades encapsuláveis que consiste no encapsulamento de explantes em uma matriz de alginato. Os explantes podem ser ápices caulinares, embriões ou outras partes capazes de serem convertidas em plântulas *in vitro* ou *ex vitro* (YUGAR et al., 2009). As unidades encapsuláveis possuem um grande potencial de aplicações pois facilitam o manuseio dos explantes, possuem um amplo uso na conservação e intercâmbio de material genético (RAI et al., 2009).

Com relação à mangabeira, a produção de unidades encapsuláveis foi realizada por Nogueira (2010), utilizando como explante gemas apicais, porém para criopreservação o tamanho desse explante não é o mais adequado sendo necessário investigar a viabilidade da técnica para ápices caulinares, com no máximo 1 mm².

Outro ponto da cultura de tecido da mangabeira que precisa ser otimizado é o enraizamento *in vitro* e a aclimatização, pois baixas porcentagens de enraizamento foram obtidas por Soares et al. (2007). Esse enraizamento pouco eficiente foi elucidado por Soares et al. (2011), quando observaram que a

citocinina empregada na fase de multiplicação produzia um efeito residual negativo no enraizamento. Para *H. speciosa* ainda se faz necessária a avaliação do efeito de diferentes auxinas e concentrações no enraizamento *in vitro*, após a minimização do efeito residual da citocinina utilizada na fase multiplicação.

Com relação à fase de aclimatização das plântulas de mangabeira multiplicadas *in vitro* existe uma carência de estudos sobre a utilização de diferentes substratos. Essas informações são importantes, pois os explantes desenvolvidos *in vitro* estão em uma condição na qual os fatores estressantes são controlados ao máximo e a mudança dessa condição para campo ou casa-de-vegetação necessita de uma fase de aclimatização (HAZARIGA, 2003).

Objetivou-se avaliar diferentes técnicas como a germinação *in vitro* de embriões zigóticos, produção de unidades encapsuláveis, o meio de cultivo para estabelecimento de ápices caulinares, o efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina no enraizamento *in vitro* da mangabeira e diferentes substratos na fase de aclimatização, assim aprimorando a micropropagação para a espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para os experimentos descritos nos itens 2.1 e 2.2, foram utilizados como fonte de explantes, brotações de mangabeira previamente multiplicadas *in vitro* em meio Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 8,87 μM de 6 benzilaminopurina (BAP), 0,09 M de sacarose, geleificado com 7 g L^{-1} de ágar, pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem à 121 °C, durante 20 minutos conforme Soares et al. (2011).

2.1 Meio de cultivo para ápices caulinares

Ápices caulinares com cerca de 1mm^2 foram excisados com o auxílio de um microscópio estereoscópico e inoculados em meio WPM e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ambos com a ausência ou $8,87\ \mu\text{M}$ de BAP, suplementados com $0,09\ \text{M}$ de sacarose, $20\ \text{ppm}$ de ácido ascórbico, geleificado com $7\ \text{g L}^{-1}$ de ágar e pH ajustado em $5,8$ antes da autoclavagem à 121°C , durante 20 minutos. Após a inoculação, os ápices foram mantidos no escuro por sete dias e, em seguida, transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

Aos 30 dias foram analisados o número de folhas e a massa de matéria fresca dos ápices caulinares. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, cada repetição constituída por uma placa de Petri, com 10 ápices caulinares.

2.2 Unidades encapsuláveis

Ápices caulinares de mangabeira, com cerca de 1mm^2 , foram excisados com o auxílio de microscópio estereoscópico e imersos em matriz de alginato de sódio $2,5\%$ constituído das formulações de sais WPM ou MS, ambas acrescidas de $8,87\ \mu\text{M}$ BAP e pH ajustado em $5,8$. Os ápices foram resgatados individualmente com o auxílio de uma pipeta automática e gotejados ($250\ \mu\text{L}$) em solução de cloreto de cálcio ($100\ \text{mM}$), para a complexação, durante 20 minutos.

As cápsulas complexadas foram imersas em solução de nitrato de potássio ($100\ \text{mM}$) por 15 minutos para a descomplexação e, em seguida, lavadas com água destilada e autoclavada. As unidades encapsuláveis foram inoculadas nos diferentes meios de cultura WPM ou MS, também acrescido de $8,87\ \mu\text{M}$ de BAP e suplementado com $0,09\ \text{M}$ de sacarose, $7\ \text{g L}^{-1}$ de ágar e pH

ajustado em 5,8. Após a inoculação, cápsulas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16h de fotoperíodo e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (cápsulas x meios), com nove repetições, cada repetição composta por três tubos com uma unidade encapsulável em cada. Após 30 dias foi avaliada a sobrevivência dos ápices.

2.3 Germinação e criopreservação de embriões zigóticos

Frutos maduros de mangabeira foram coletados em Itaporanga-SE e despolidos com o auxílio de uma peneira. As sementes foram lavadas com água corrente em abundância.

Em câmara de fluxo laminar (CFL), as sementes foram imersas em álcool 70% por 60 segundos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 12 minutos. Decorrido esse intervalo, as sementes foram enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Os embriões foram excisados com o auxílio de pinças e bisturis e acomodados sobre um disco de papel filtro estéril ($\varnothing = 6 \text{ cm}$), em uma placa de Petri e desidratados em CFL por diferentes períodos de tempo (20, 60, 100 e 120 minutos) para determinação da umidade e para a germinação *in vitro* dos embriões criopreservados ou não. A temperatura da sala de inoculação foi mantida em $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Após esses intervalos, os embriões foram diretamente inoculados em meio de cultura ou sofreram uma reidratação osmocondicionada.

A curva de desidratação dos embriões após a exposição em CFL foi determinada utilizando-se três repetições, cada uma constituída de sete embriões. A massa fresca e seca foi determinada com o auxílio de uma balança de precisão. Para a determinação da massa seca, os embriões permaneceram por

48 horas, em uma estufa à 60 °C. A umidade dos embriões foi expressa em porcentagem.

Para a reidratação, os embriões foram acondicionados em criotubos e foi adicionado 4 mL de meio MS líquido, suplementado com 1M de sacarose. Foram utilizados três embriões por criotubo. Após 30 minutos, 1 mL do meio contendo 1M de sacarose foi retirado e substituído por uma solução de meio MS suplementada com 0,3M de sacarose. Esse procedimento foi repetido por três vezes até atingir os 60 minutos (tempo total de reidratação osmocondicionada). Os embriões, reidratados pelo osmocondicionamento ou não, foram inoculados em meio MS, acrescido de 0,09 M de sacarose e geleificado com 3 g L⁻¹ de Phytigel (FREIRE et al., 2011). O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem à 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, 16h de fotoperíodo e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹.

Para a criopreservação, os embriões zigóticos de mangabeira, após os períodos de desidratação foram imersos em nitrogênio líquido por 24 horas antes do descongelamento em banho-maria à 40 ± 2 °C, durante dois minutos. Após o descongelamento, os embriões foram reidratados de forma osmocondicionada antes da inoculação em meio de cultura.

Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea e o número de folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e com nove repetições por tratamento. Os embriões não imersos em nitrogênio líquido foram expostos ou não à reidratação osmocondicionada, sendo que cada repetição era composta por um tubo de ensaio com um embrião. Para os embriões imersos em nitrogênio líquido foram utilizadas 21 repetições, cada uma composta por um tubo contendo um embrião.

2.4 Enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira

Brotações de mangabeira multiplicadas *in vitro*, com aproximadamente 5 cm de comprimento, foram individualizadas e transferidas para meio WPM, com metade da concentração dos sais, suplementado com 0,09M de sacarose, geleificado com 7 g L⁻¹ ágar e pH ajustado em 5,8, antes da autoclavagem. Após 15 dias, as brotações foram inoculadas em meio de indução de enraizamento que consistia de: WPM basal e WPM com diferentes concentrações (2,46; 4,92; 9,84 e 19,68 µM) das auxinas ácido 3-indol acético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB), suplementado com 0,09 M de sacarose, geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Após seis dias no meio de indução de enraizamento, as brotações foram transferidas para o meio de expressão WPM, suplementado com 0,09M de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Durante o experimento, as brotações foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, irradiância de 36 µmol.m⁻².s⁻¹ e com fotoperíodo de 16 horas. Apenas durante o período que permaneceram no meio suplementado com auxina, as brotações permaneceram no escuro.

Após 30 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa de matéria fresco das raízes. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento e cada repetição foi constituída de cinco tubos de ensaio com uma brotação por tubo.

2.5 Aclimatização

Brotações de mangabeira foram enraizadas utilizando-se o meio de indução de enraizamento, WPM suplementado com 9,84 µM de AIB, 0,09M sacarose, geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da

autoclavagem. As brotações permaneceram por seis dias nesse meio, sendo em seguida transferidas para o meio WPM, suplementado com 0,09M de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Após 30 dias as brotações enraizadas foram aclimatizadas utilizando-se três diferentes substratos: vermiculita, substrato comercial- Multiplant[®], e uma mistura (vermiculita + substrato comercial; 1:1). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 28° ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol. m⁻² s⁻¹.

Decorridos 30 dias, foram avaliadas a sobrevivência, a massa fresca e seca do sistema radicular e o incremento no comprimento das plantas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 20 repetições, e, em cada repetição uma planta por tubete.

O teor de clorofila foi determinado através de um medidor portátil, modelo SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Minolta, Japão). Para a determinação do índice foi realizada a média de três medições por folha, com cinco repetições por tratamento. Os dados foram obtidos de uma das folhas do primeiro par, completamente expandido.

2.6 Análises estatísticas

Utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA, as médias quantitativas foram analisadas por regressão e as qualitativas pelo teste de Tukey, e, para ambos foi utilizado $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Meio de crescimento para ápices caulinares

Foi observada a sobrevivência de ápices caulinares de mangabeira em todos os meios de cultivo analisados, entretanto, a adição de $8,87 \mu\text{M}$ de BAP ao meio MS permitiu uma maior massa de matéria fresca dos ápices (Figura 1).

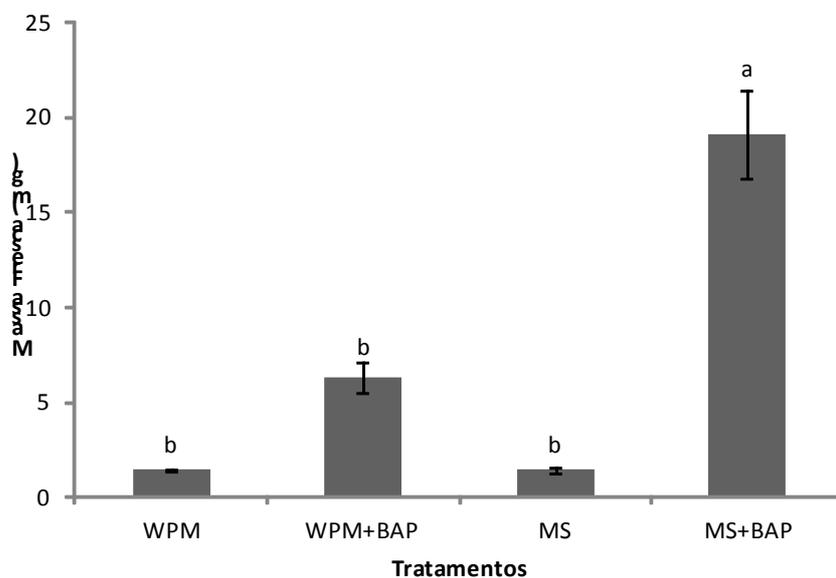


Figura 1 Massa de matéria fresca de ápices caulinares de mangabeira inoculados em diferentes meios de cultura. Médias (\pm Erro Padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

O efeito do BAP, com relação ao número de folhas foi significativo ($p < 0,001$). A maior média (4,6 folhas) foi observada nos explantes cultivados em meio MS suplementado com BAP. Ápices cultivados em meio MS, com adição de BAP, diferiram significativamente dos controles. Diferentemente da

massa fresca dos ápices caulinares (Figura 1), o meio WPM apresentou explantes com maior média de folhas que o meio MS ou WPM basal (Figura 2).

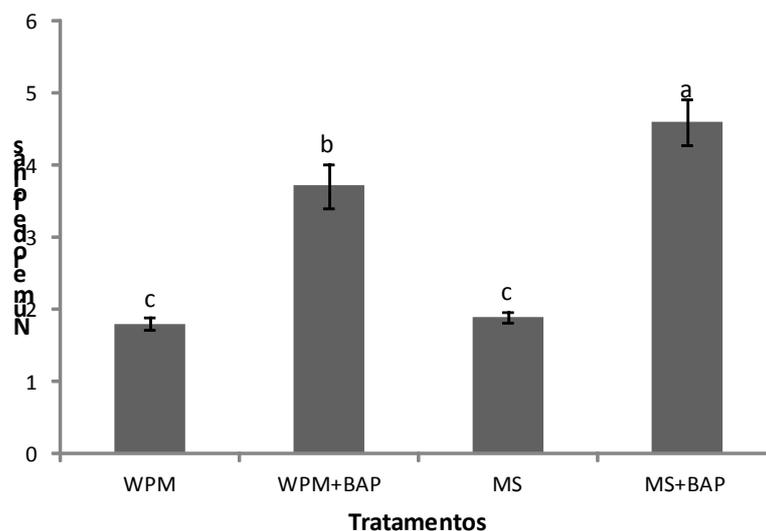


Figura 2 Número médio de folhas por ápices caulinares de mangabeira inoculados em diferentes meios de cultivo. Médias (\pm Erro Padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Jain et al. (2009) observaram que o meio WPM suplementado com BAP promoveu maior crescimento em ápices caulinares de *Harpagophytum procumbens*, em comparação ao meio MS.

O maior crescimento em termos de massa de matéria fresca dos ápices caulinares (Figura 3), bem como o maior número de folhas está relacionado ao efeito das citocininas na regulação da divisão celular e desenvolvimento do meristema apical (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; PERILLI; MOUBAYIDIN; SABATINI, 2010; WERNER; SCHMÜLLING, 2009).

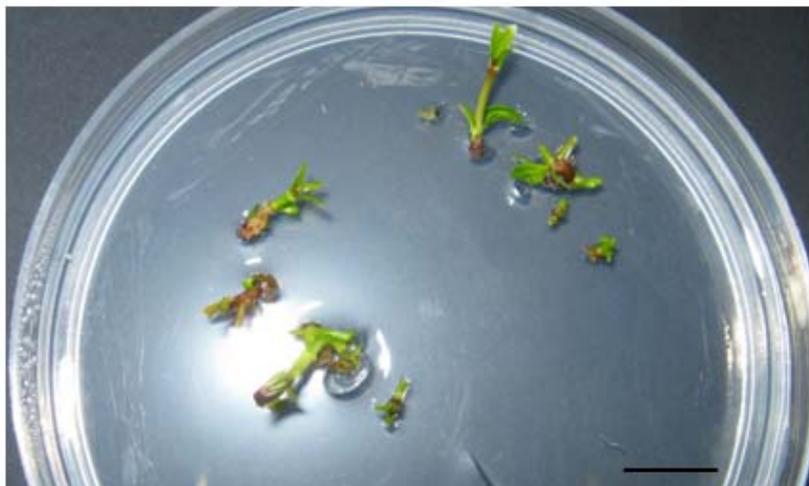


Figura 3 Foto aos 30 dias após a inoculação dos ápices caulinares em meio MS acrescido de $8,87 \mu\text{M}$ BAP. Barra = 1 cm

3.2 Unidades encapsuláveis

Foram observadas elevadas taxas de sobrevivência dos ápices encapsulados, com média geral de 74%, porém não foram observadas diferenças significativas nas diferentes constituições de cápsulas e meio de cultivo. Na figura 4 é apresentado um ápice caulinar com alguns primórdios foliares em crescimento.

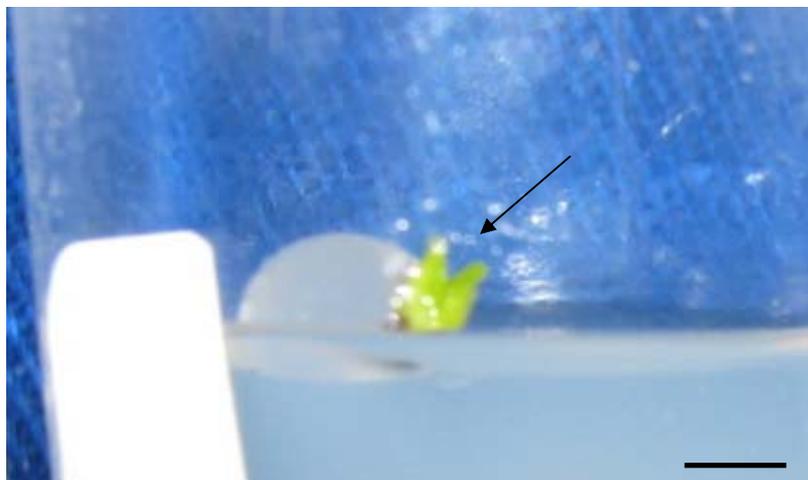


Figura 4 Unidade encapsulável de mangabeira aos 30 dias após a inoculação. A seta indica o rompimento da cápsula e o crescimento do ápice caulinar. Barra = 0,5 cm.

A porcentagem de sobrevivência obtida nesse estudo foi similar à obtida por Asmah et al. (2011) que obtiveram taxas superiores a 70%, dependendo da constituição da cápsula em híbridos de *Acacia*. Esses resultados positivos utilizando ápices caulinares com tamanho inferior a 1 mm² servem de base para protocolos de conservação *in vitro* que envolvam o uso de unidades encapsuláveis como o encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação (RAI et al., 2009). Dessa forma, mostra-se promissor o avanço de estudos utilizando essa técnica de cultura de tecidos.

3.3 Germinação e crioprervação de embriões zigóticos

Os embriões criopreservados não sobreviveram ao processo, enquanto os embriões não imersos em nitrogênio líquido não apresentaram diferença

significativa em nenhum dos parâmetros analisados para a inoculação direta no meio de cultivo ou com a reidratação osmocondicionada.

Os embriões zigóticos apresentaram teor de umidade inicial de 66% e ao final dos 120 minutos de desidratação em CFL essa umidade foi reduzida até atingir 25% (Figura 5). Esses valores são bem superiores aos observados em sementes de pinhão-manso que podem ser desidratadas ao nível de 8% de umidade o que permite tolerar a imersão em nitrogênio líquido (SILVA et al., 2011).

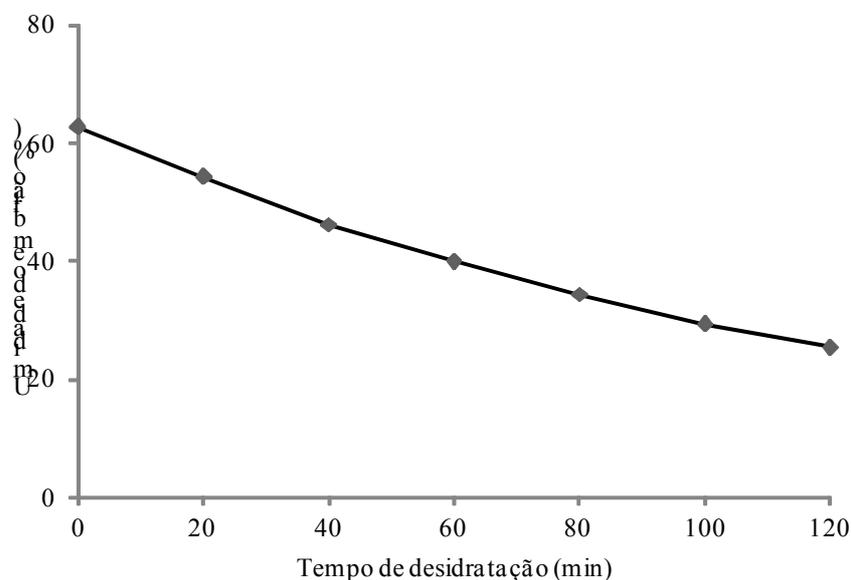


Figura 5 Curva de desidratação de embriões zigóticos de mangabeira submetidos a diferentes tempos de desidratação em câmara de fluxo laminar a 25°C.

A desidratação de embriões de mangabeira por 20 minutos em CFL não foi danosa, sendo observada 100% de germinação. Entretanto, após 120 minutos de desidratação a germinação foi reduzida drasticamente para 33% (Figura 6).

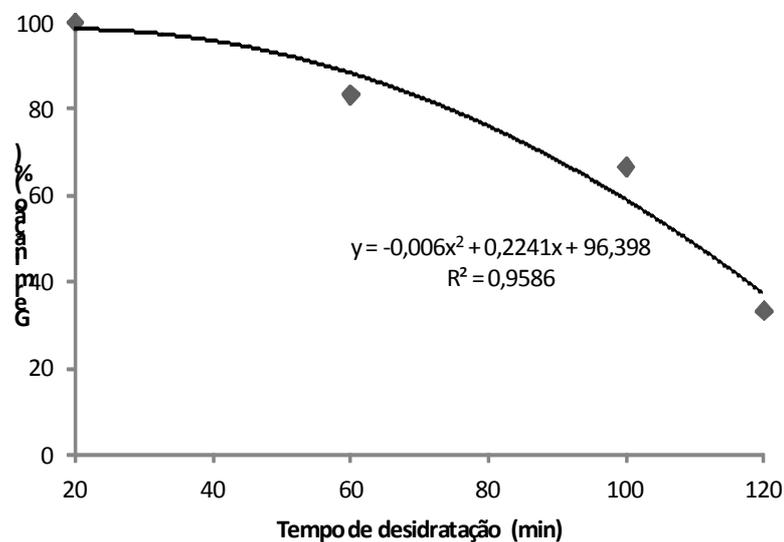


Figura 6 Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de mangabeira submetidos a diferentes tempos de desidratação em câmara de fluxo laminar a 25 °C.

Essas médias de germinação são superiores às observadas por Freire et al. (2011), que obtiveram 92% utilizando meio MS sem adição de fitorreguladores para a germinação de mangabeira. Engelmann (2011) descreve que a desidratação de embriões zigóticos tem como dificuldade o fato da complexidade de tecidos que compõem o embrião e têm uma sensibilidade diferenciada à desidratação.

A germinação teve início aos cinco dias após a inoculação dos embriões, quando foi possível observar o crescimento da radícula, bem como mudança na cor dos cotilédones devido à formação das clorofilas (Figura 7).

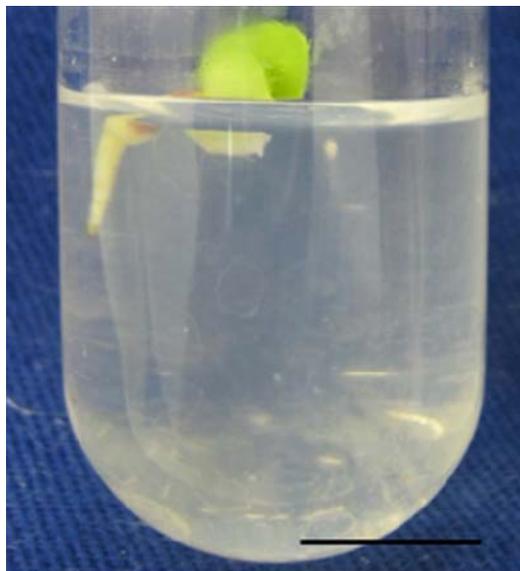


Figura 7 Embrião zigótico de mangabeira germinando *in vitro* após 5 dias de inoculação em Meio MS basal. Barra = 1 cm

Com relação ao número de folhas nas plântulas oriundas dos embriões que sofreram desidratação, pode-se observar que conforme houve um maior tempo de desidratação, reduziu-se a quantidade de folhas (Figura 8).

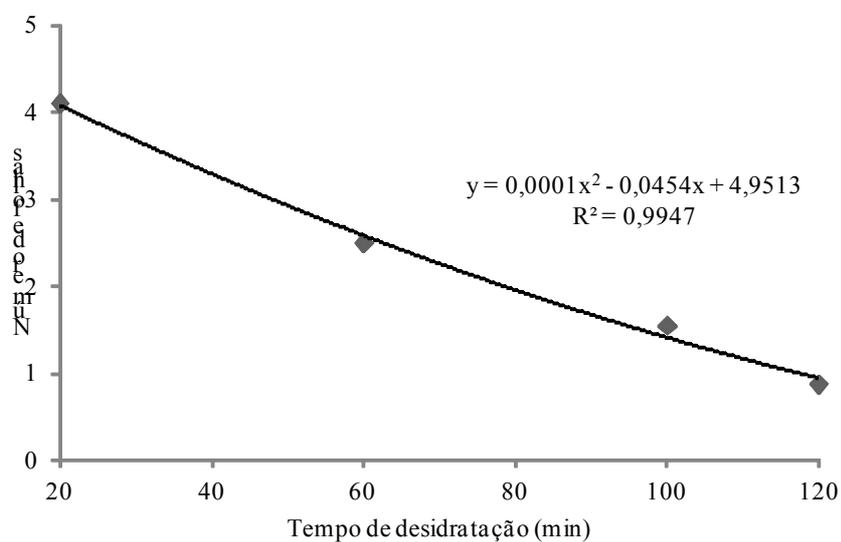


Figura 8 Número médio de folhas de plântulas obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O número de quatro folhas observado nesse experimento para o tempo de 20 minutos de desidratação é inferior ao observado por Freire et al. (2011) de 5,2 folhas para a mesma espécie. Entretanto, Freire et al. (2011) não submeteram os embriões a nenhum período de desidratação antes da inoculação.

O comprimento da parte aérea seguiu a mesma tendência observada para a germinação e para o número de folhas, ou seja, conforme os embriões zigóticos foram submetidos a tempos maiores de desidratação, houve uma redução no tamanho das plântulas obtidas (Figura 9).

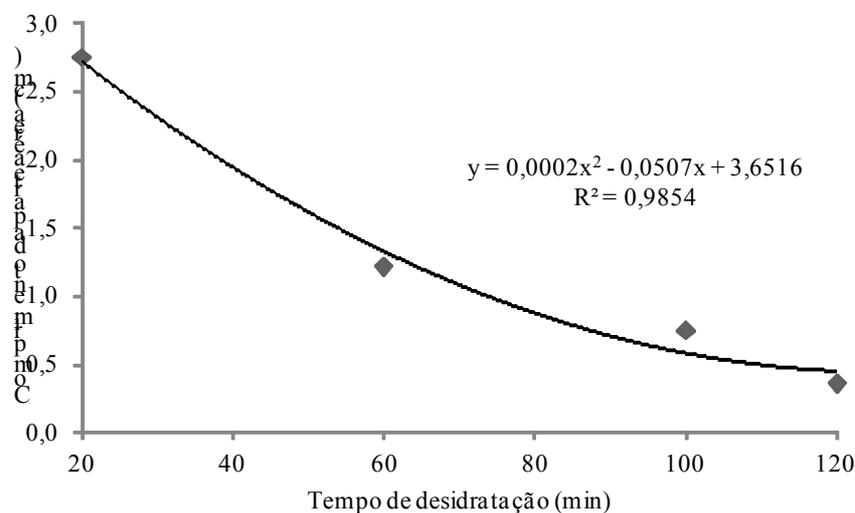


Figura 9 Comprimento médio da parte aérea de plântulas obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O comprimento da parte aérea nesse experimento foi inferior ao obtido por Freire et al. (2011) que observaram um valor médio de 4,1 cm em plântulas obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos em meio MS basal.

A redução na porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e número de folhas em função da desidratação, foram provavelmente ocasionadas por modificações deletérias intracelulares provocadas pela desidratação. De acordo com Sershen et al. (2012), a desidratação provoca alterações em diversas organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de golgi, o que compromete o metabolismo do embrião.

Sementes recalcitrantes como a de mangabeira apresentam um elevado conteúdo de água, dessa forma, mesmo o embrião excisado necessitaria de uma redução na umidade, caso o objetivo seja a criopreservação (SERSHEN et al., 2012). A partir dos resultados obtidos nesse experimento, a desidratação em CFL a 25°C por 120 minutos reduziu a umidade dos embriões a 25% (Figura 5),

comprometendo cerca de 60% da sobrevivência (Figura 6), provavelmente devido à complexidade e sensibilidade dos tecidos que compõem o embrião, pois conforme Engelmann (2011) esses são os fatores que limitam a sobrevivência dos embriões zigóticos de espécies recalcitrantes à dessecação e congelamento em nitrogênio líquido.

3.4 Enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira

O enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira apresentou diferença significativa ($p=0,0096$) para a interação “fitorregulador x concentração”. Foi observada uma diferença entre os reguladores apenas na concentração de 2,46 μM onde a auxina AIB promoveu 92% de enraizamento, diferindo do ANA e AIA nas mesmas concentrações equimolares (Figura 10). Na figura 11 é apresentada uma brotação de mangabeira enraizada *in vitro*.

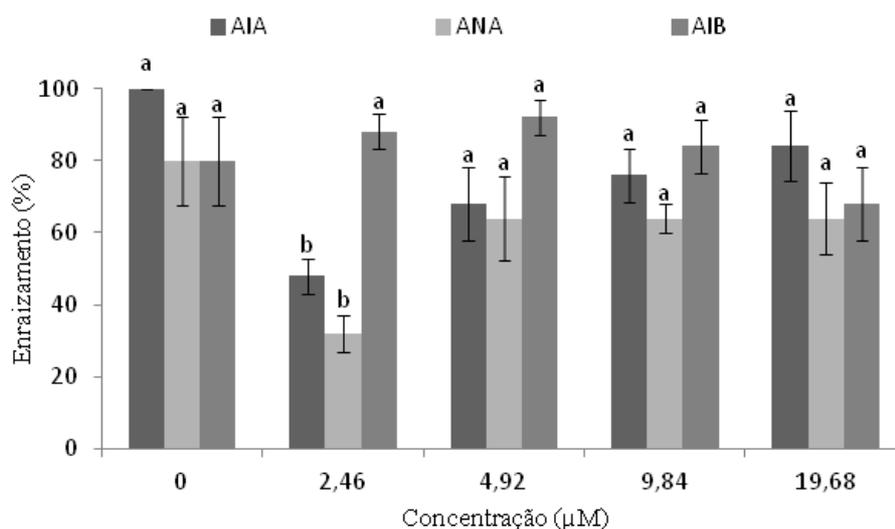


Figura 10 Porcentagem de enraizamento *in vitro* de mangabeira utilizando diferentes auxinas (AIA, ANA e AIB) e concentrações. Médias (\pm Erro Padrão), seguidas pela mesma letra na comparação entre reguladores para a mesma concentração não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Figura 11 Brotação de mangabeira enraizada *in vitro* com o emprego de 4,92 μM de AIB.

O fato da mangabeira apresentar a formação de raízes sem o fornecimento exógeno de auxina indica que os níveis endógenos são suficientes para promover o enraizamento, como observado na Figura 10. Resultado semelhante também foi observado em microestacas de amoreira preta (*Rubus sp.*), conforme Pasa et al. (2012), no qual os autores observaram a formação de raízes adventícias mesmo na ausência de aplicação de auxina exógena.

A porcentagem de enraizamento *in vitro* nesse estudo foi superior aos valores obtidos por Bastos et al. (2007) que obtiveram taxas de enraizamento de cerca de 1 a 2%, mesmo com a adição de 3 mg L^{-1} de AIB para a mangabeira. A porcentagem obtida nesse estudo também foi superior à obtida por Soares et al. (2007), avaliando o efeito da utilização de ANA e AIB em diferentes concentrações onde observaram que o primeiro fitorregulador não favoreceu o enraizamento *in vitro*, enquanto que o AIB promoveu o enraizamento em 20% dos explantes, quando foi utilizada a concentração de 3,0 mg L^{-1} .

Porém, em um estudo posterior realizado por Soares et al. (2011) foi obtido o enraizamento *in vitro* em todas as brotações utilizando 1,0 mg L^{-1} de AIB. Esse resultado com maior êxito no enraizamento foi atribuído à eliminação do efeito residual do regulador de crescimento utilizado na fase de multiplicação, sendo o BAP e a cinetina os fitorreguladores com maiores efeitos

inibitórios no desenvolvimento radicular. Porém, após a detecção desse efeito residual e sua eliminação não foram realizados estudos avaliando-se a ação de diferentes concentrações de auxina no enraizamento *in vitro*.

Os resultados presentes nesse estudo com relação a porcentagem de brotações enraizadas com a aplicação de AIB no meio de cultura estão de acordo com Campos et al. (2013) que obtiveram médias 92% em amburana de cheiro (*Amburana cearensis*) utilizando 10 μM de AIB. Ao comparar a porcentagem de enraizamento obtida para a mangabeira em relação às diferentes auxinas pode-se observar que, em baixas concentrações como 2,46 μM , o AIB é superior ao AIA e ANA. Bandeira et al. (2012) também observaram que a aplicação de AIB é superior ao ANA, no enraizamento de ameixeira japonesa.

O número de raízes apresentou diferença significativa ($p = 0,0045$) para a interação “fitorregulador x concentração”. O maior número de raízes obtido foi de 4,9 raízes utilizando 19,68 μM de AIA. Esse resultado diferiu significativamente em relação ao efeito do ANA e AIB nas mesmas concentrações (Figura 12).

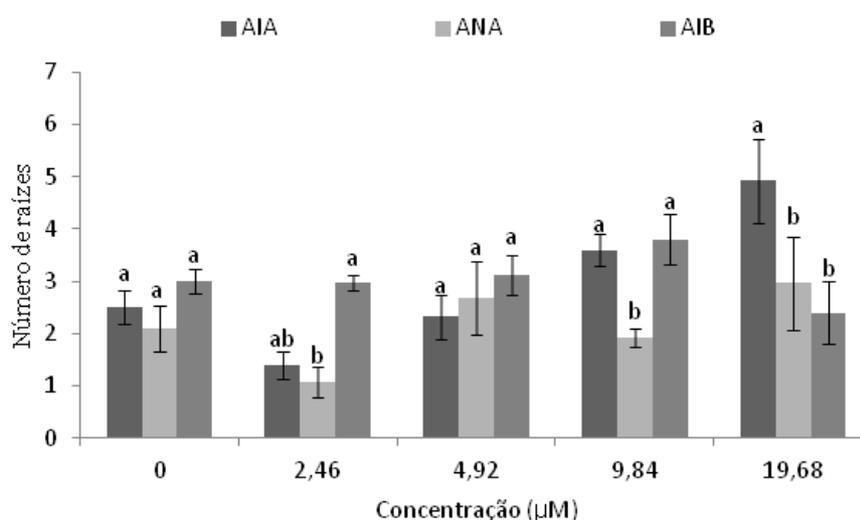


Figura 12 Número de raízes obtidas a partir do enraizamento *in vitro* de mangabeira, utilizando diferentes auxinas (AIA, ANA e AIB) e concentrações. Médias (\pm Erro Padrão) seguidas pela mesma letra na comparação entre reguladores para uma mesma concentração não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Pode-se observar que, em baixas concentrações (2,46 μ M) o AIB é superior ao ANA promovendo maior número de raízes. Foi observada uma redução no valor médio do número de raízes, quando a concentração de AIB foi 19,68 μ M (Figura 12).

Com relação ao comprimento da maior raiz, foi observada diferença significativa ($p=0,0084$) para a “interação concentração x fitorregulador”. O tratamento controle apresentou média geral de comprimento da maior raiz de 27 mm, enquanto para a concentração de 2,46 e 4,92 μ M de AIB foram obtidas raízes com 32 e 35 mm, respectivamente, diferindo do AIA e ANA nas mesmas concentrações (Figura 13).

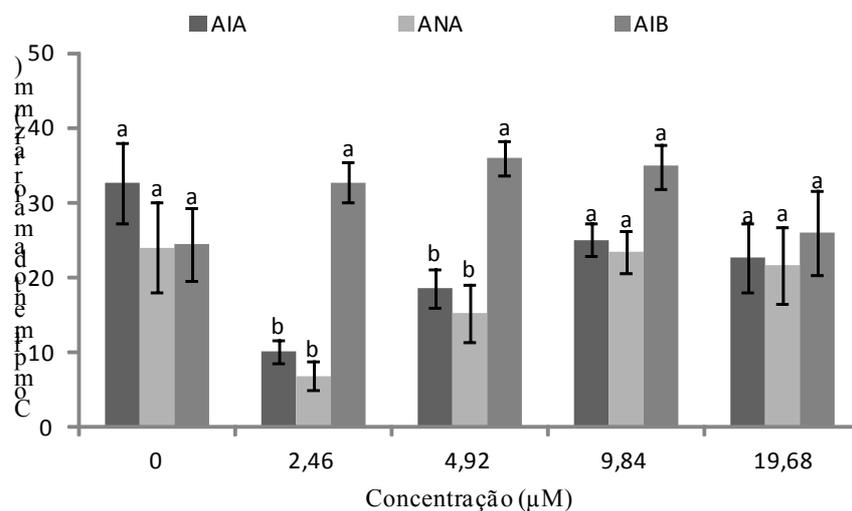


Figura 13 Comprimento da maior raiz obtida a partir do enraizamento *in vitro* de mangabeira, utilizando diferentes auxinas (AIA, ANA e AIB) e concentrações. Médias (\pm Erro Padrão) seguidas pela mesma letra na comparação entre reguladores para uma mesma concentração não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tanto os valores do número de raízes quanto o comprimento da maior raiz apresentados neste trabalho são superiores aos obtidos no enraizamento *in vitro* descrito por Soares et al. (2011) para a mesma espécie, que obtiveram a média de 1,7 raízes e com comprimento da maior raiz de 0,94 cm, utilizando 1 mg L⁻¹ de AIB. Para outras espécies, o emprego de ácido indolbutírico também promoveu a formação de raízes, como em *Citrus macrophylla* que apresentou 1,5 raízes, com comprimento médio de 2,4 cm, quando se empregou uma concentração de 3,0 mg L⁻¹ de AIB (TALLÓN; PORRAS; TORNERO, 2012).

Outra variável analisada que apresentou diferença significativa com relação à concentração de fitoregulador empregada foi a massa fresca das raízes ($p = 0,0015$). A maior média de massa fresca das raízes foi obtida com a concentração de 9,84 μ M das auxinas avaliadas (Figura 12), apresentando o valor médio de 44 mg.

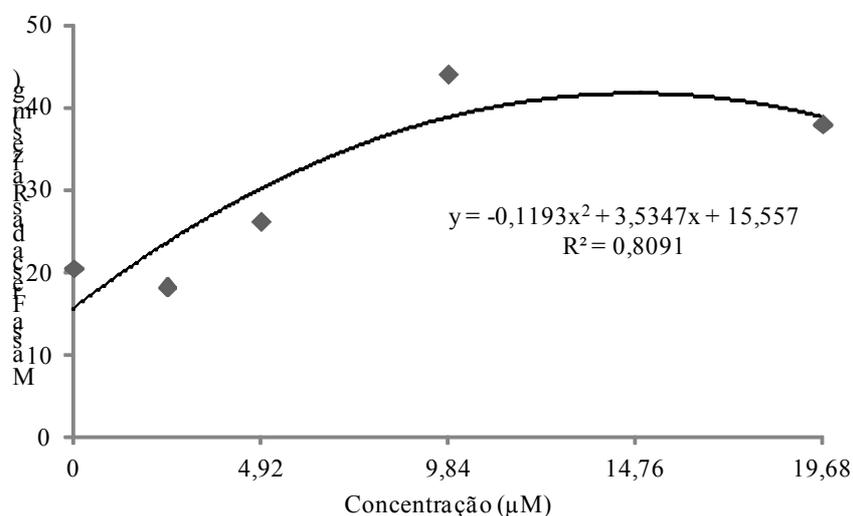


Figura 14 Massa fresca das raízes de brotações de mangabeira enraizadas *in vitro* utilizando diferentes concentrações das auxinas AIA, ANA e AIB.

Assim como para a mangabeira, Santos et al. (2006) observaram que a aplicação de auxina (AIB) favoreceu a formação e desenvolvimento *in vitro* do sistema radicular de pequi, mas para essa espécie os melhores resultados foram obtidos com a adição de 3 mg L⁻¹ de AIB. A aplicação de AIB também mostrou-se favorável no enraizamento *in vitro* de jenipapeiro que, diferentemente da mangabeira, na sua ausência não foi observado enraizamento (ROCHA et al., 2008).

3.5 Aclimatização de brotações de mangabeira enraizadas *in vitro*

Na fase de aclimatização, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros de crescimento analisados, sendo a média geral de sobrevivência 90%, independente do tipo de substrato. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Costa, Nepomuceno e Santana (2010) que

obtiveram 85% de sobrevivência em *Erythrina velutina* Willd, na fase de aclimatização.

O comprimento da maior raiz apresentou a média geral de 8,74 cm, com em média de 2,7 raízes, a massa fresca das raízes apresentou média geral de 78 mg enquanto a massa fresca da plântula foi de 304 mg. A altura final média foi de 6,6 cm.

3.6 Teor de clorofila de brotações aclimatizadas

As medidas realizadas com o clorofilômetro mostraram uma diferença significativa entre os substratos utilizados para o teor de clorofila de brotações após 30 dias de aclimatização (Figura 15).

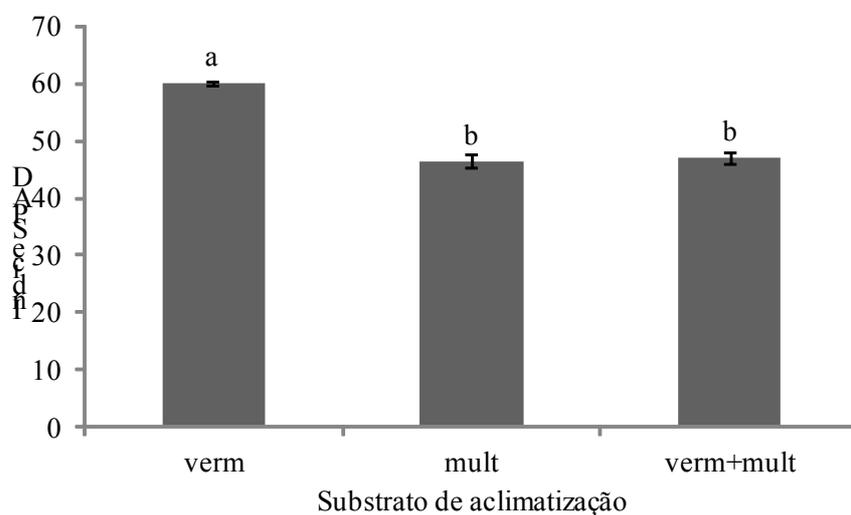


Figura 15 Índice de clorofila de plantas de mangabeira aclimatizadas em diferentes substratos (verm= vermiculita; mult= Multiplant®; verm + mult=

vermiculita + Multiplant[®]). Médias (\pm Erro Padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Os valores obtidos por meio do clorofilômetro permitem inferir que as plantas aclimatizadas no substrato vermiculita apresentaram folhas com maiores teores de clorofila, uma vez que esse equipamento permite uma alta correlação com os conteúdos de clorofila na folha (JESUS; MARENCO, 2008). Esses maiores valores de clorofila podem auxiliar na fase de aclimatização e transplântio para o campo (BALDOTTO et al., 2009), pois é um dos fatores que contribuem para a eficiência fotossintética das plantas (SILVA et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

Ápices caulinares de mangabeira *in vitro* podem ser cultivados em meio MS com a adição de 8,87 μ M de BAP.

Ápices caulinares podem ser encapsulados em matriz de alginato compostas de sais MS ou WPM.

Embriões zigóticos de mangabeira podem ser desidratados em câmara de fluxo laminar por até 20 minutos, sem comprometer a taxa de germinação.

O enraizamento *in vitro* da mangabeira pode ser realizado em meio WPM sem adição de auxina e o emprego de 9,84 μ M das auxinas AIA, ANA e AIB permitem um maior crescimento em termo de massa de matéria fresca do sistema radicular.

A vermiculita, substrato comercial - Multiplant[®] ou a mistura (vermiculita + substrato comercial) permitem a sobrevivência de mudas micropropagadas de mangabeira durante a aclimatização.

REFERÊNCIAS

ASMAH, H. et al. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia* hybrid shoot and axillary buds. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 40, n. 10, p. 7820-7824, Aug. 2011.

BALDOTTO, L. E. B. et al. Desempenho do abacaxizeiro ‘vitória’ em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 55, n. 4, p. 979-990, ago. 2009.

BANDEIRA, J. M. et al. Rooting and acclimatization of the Japanese plum tree, cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 597-603, jun. 2012.

BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 1122-1124, jul. 2007.

BHATTI, S.; JHA, G. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 11, p. 1215-1225, Aug. 2010.

CAMPOS, V. C. A. et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639-644, abr. 2013.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, maio 2010.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, Nov. 2011.

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

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; LIMA, G. P. F. Avaliação da aplicação exógena de poliaminas no crescimento de calos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1206-1210, dez. 2009.

FREIRE, K. C. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, Aracaju, v. 7, n. 11, p. 1-7, nov. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 520 p.

HAZARIGA, B. N. Acclimatization on tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, Dec. 2003.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 371-393.

JAIN, N. et al. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip in *Harpagophytum procubens*. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 117-121, Nov. 2009.

JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 815-818, dez. 2008.

LEDO, A. S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, jul./ago. 2007.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, May/June 1980.

MACHADO, L. L. et al. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 431-435, maio 2004.

MOYO, M.; STADEN, J. V. Micropropagation of Anacardiaceae species of economic importance. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 49, n. 2, p. 85-96, Dec. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

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

PASA, M. S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, ago. 2012.

PERILLI, S.; MOUBAYIDIN, L.; SABATINI, S. The molecular basis of cytokinin function. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 21-26, Feb. 2010.

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

RAI, M. et al. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, Apr. 2009.

ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, set. 2008.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 531-560, May 2006.

SÁ, A. J. et al. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 406-414, jul./ago. 2012.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, jan. 2011.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, ago. 2006.

SANTOS, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul./set. 2011.

SERSHEN, B. et al. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, Wien, v. 249, n. 1, p. 171-186, Jan. 2012.

SILVA, E. A. et al. Efeito de diferentes substratos na produção de mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 925-929, set. 2009.

SILVA, R. C. et al. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-mansão originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 836-844, ago. 2011.

SOARES, F. P. et al. **Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Lavras: UFLA, 2006. 12 p. (Boletim Agropecuário, 67).

_____. Efeito de meios cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1847-1852, mar. 2009.

_____. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

_____. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev. 2011.

TALLÓN, C. I.; PORRAS, I.; TORNERO, O. P. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 488-499, 2012.

WERNER, T.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 527-538, Sept. 2009.

YUGAR, E. W. S. et al. Microshoots encapsulation and plant conversion of *Musa sp.* Cultivar 'Grand Naine'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 998-1004, jul. 2009.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DE MANGABEIRA

RESUMO

A mangabeira é uma espécie nativa dos Tabuleiros Costeiros do Nordeste e Cerrado, porém, devido à especulação imobiliária e expansão da agricultura, vem sofrendo um processo de erosão genética. Como forma de minimizar esse problema, estratégias de conservação *ex situ* podem ser adotadas, mas por apresentar sementes recalcitrantes, a mangabeira não pode ser conservada em bancos de sementes convencionais. Dessa forma torna-se necessário o desenvolvimento de outras estratégias de conservação. A criopreservação consiste no armazenamento de material biológico em temperatura ultrabaixa (-196 °C) o que garante a preservação por períodos indeterminados. Objetivou-se desenvolver protocolos de criopreservação de ápices caulinares de mangabeira utilizando as técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação. Brotações de mangabeira estabelecidas *in vitro* tiveram os ápices caulinares excisados com o auxílio de um bisturi em microscópio estereoscópico. Esses explantes foram utilizados para os experimentos de tempos de imersão em solução de carregamento (20, 60, 90 e 120 minutos), seguida ou não pela imersão por 15 minutos em solução de vitrificação vegetal 2 (PVS2). Foi avaliado o efeito de diferentes tempos de imersão em PVS2 (15, 30, 45 e 60 minutos) de ápices caulinares não pré-cultivados ou pré-cultivados em meio WPM, com 0,3 M de sacarose por 0, 24 e 48 horas. Para esse último foram apenas avaliados os tempos de 15 e 30 minutos em PVS2, antes da criopreservação pela técnica de *droplet vitrification*. Também foi avaliada a criopreservação pela técnica de vitrificação utilizando-se os períodos de 15, 30, 45 e 60 minutos em PVS2. Foram testados os meios WPM com 8,87 µM de BAP e WPM com 3,33 µM de BAP e 0,27 µM de ANA, para a regeneração dos ápices criopreservados. O tempo de imersão na solução de carregamento por 20 minutos, com a posterior imersão em PVS2, permitiu a criopreservação. Ambas as técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação permitiram a criopreservação de ápices caulinares de mangabeira. Também foi observado que o tempo de 24 horas e o meio WPM, acrescido de 3,33 µM de BAP 0,27 µM de ANA, permitem uma maior porcentagem de retomada de crescimento de ápices após a criopreservação.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes. *Droplet vitrification*. Vitrificação. Criopreservação. Conservação *in vitro*.

ABSTRACT

Mangaba tree is a native species of the Northeast Coastal Tablelands and Cerrado, but due to speculation and expansion of agriculture is experiencing a process of genetic erosion. In order to minimize this problem *ex situ* conservation strategies can be adopted, but mangaba tree presents recalcitrant seeds and can not be stored in conventional seed banks, so it becomes necessary to develop other conservation strategies. Cryopreservation is the storage of biological materials at ultra-low temperature (-196 °C) which ensures the preservation for indefinite periods. The aim of this study was to develop cryopreservation protocols for mangaba tree shoot tips using the vitrification and droplet vitrification techniques. Shoot tips were excised with a scalpel in stereoscopic microscope from shoots *in vitro* established. These explants were used for the immersion experiments for different period in loading solution (20, 60, 90 and 120 minutes), followed or not by immersion for 15 minutes in a plant vitrification solution 2 (PVS2). The effect of different periods of treatment in PVS2 (15, 30, 45 and 60 minutes) of shoot tips precultured or no-precultured in WPM medium with 0.3 M sucrose for 0, 24 and 48 hours were evaluated. For the latter, only the period of 15 and 30 minutes in PVS2 were evaluated prior cryopreservation by droplet vitrification technique. The cryopreservation by vitrification technique using different periods (15, 30, 45 and 60 minutes) of PVS2 treatment was also evaluated. The media WPM with 8.87 µM BAP and WPM with 3.33 µM BAP plus 0.27 µM NAA was evaluated for the optimization of the shoot tips regrowth after cryopreservation. The immersion in the loading solution for 20 minutes with subsequent immersion in PVS2 allowed to cryopreservation. Both, vitrification and droplet vitrification techniques, allowed the shoot tips cryopreservation, It was also observed that the 24-hour pre-culture on 0.3 M sucrose and the WPM medium plus 3,33 µM BAP and 0,27 µM NAA allowed a better regrowth percentage of cryopreserved shoot tips.

Keywords: *Hancornia speciosa*. Droplet vitrification. Vitrification. Cryopreservation. *In vitro* conservation.

1 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Brasil que ocorre nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado. A espécie possui potencial econômico devido à utilização de seus frutos para o consumo *in natura*, além da produção de sucos, doces e sorvetes (MOURA et al., 2011). Além disso, estudos recentes demonstraram que o extrato das folhas possui efeito anti-hipertensivo e vasodilatador (PEREIRA et al., 2012), enquanto o látex possui propriedades anti-inflamatórias (MARINHO et al., 2011). Essas recentes descobertas apontam também o potencial medicinal dessa espécie.

Entre as principais dificuldades para a exploração comercial dessa espécie, estão o fato das sementes serem recalcitrantes e a dificuldade na propagação assexuada. Além disso, a mangabeira vem sofrendo processo de erosão genética em diversas populações naturais devido à expansão da atividade agropecuária e crescimento das cidades nas áreas naturais de ocorrência (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011). Nesse sentido, estudos de micropropagação são necessários para permitir a multiplicação dos genótipos de interesse (SÁ et al., 2012), além de garantir formas para a conservação *in vitro* da diversidade da espécie (SANTOS et al., 2011).

Atualmente, a conservação de populações de mangabeira é realizada por meio de bancos de germoplasma em campo, mas esses exigem um grande aporte financeiro (LI; PRITCHARD, 2009) e estão suscetíveis ao ataque de pragas e doenças (BARRACO; SYLVESTRE; ENGELMANN, 2011). Outra estratégia adotada é o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* através da técnica de crescimento lento com o emprego de sorbitol (SANTOS et al., 2011), manitol e ácido abscísico (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011). Engelmann (1991) e Lata et al. (2010) citam que a redução da temperatura do ambiente de cultivo é o

principal recurso para obter-se o crescimento lento, entretanto, para mangabeira não existe nenhum relato na literatura do uso deste recurso para a conservação *in vitro*.

A adoção dessa estratégia de conservação *in vitro* tem como vantagem a maior facilidade de troca de material vegetal entre instituições (PANTEÑA; BARBA, 2011). Entretanto, esse é um tipo de conservação a médio prazo que exige manutenção constante das coleções *in vitro*, aumentando os custos e o risco inerente de contaminação (BURRIT, 2008).

Já a criopreservação, que é a conservação *in vitro* de material biológico em temperatura ultrabaixa (-196°C), em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011), é uma técnica muito bem-vinda de conservação *ex situ*, principalmente para as espécies em que a conservação em bancos de sementes não é viável (PILATTI et al., 2011), seja pela incapacidade de produção de sementes de algumas espécies ou por possuírem sementes recalcitrantes (KACZMARCZYK et al., 2011). O armazenamento em nitrogênio líquido é um método seguro e economicamente viável (SANT et al., 2008) e permite a conservação *in vitro* a longo prazo (CASTILLO et al., 2010; CEJAS et al., 2012; REED et al., 2011).

Uma vez que esta espécie não possui nenhuma forma estabelecida de conservação a longo prazo, objetivou-se avaliar a eficiência das técnicas *droplet vitrification* e vitrificação para a criopreservação de ápices caulinares de mangabeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Sementes de mangabeira foram coletadas no município de Pirambu-SE, Brasil. Os frutos foram despolpados e, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) durante 15 minutos, em seguida lavadas com água destilada e autoclavada em abundância e inoculadas em meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,09M de sacarose, 7 g L⁻¹ ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem à 121°C, durante 20 minutos (SOARES et al., 2009). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°±2°C, irradiância de 36 µmol.m⁻².s⁻¹ e com fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias foram iniciados os ciclos de multiplicação.

A partir das plântulas obtidas pela germinação *in vitro*, segmento nodais de mangabeira foram excisados e multiplicados em meio WPM, suplementado com 8,87 µM BAP (6-benzilaminopurina), 0,09M de sacarose e geleificado com 7g L⁻¹ ágar (SOARES et al., 2011). O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias, por cinco vezes, e então os ápices caulinares foram extraídos para os testes de criopreservação.

A temperatura da sala de crescimento durante a fase de micropropagação ou de cultivo dos ápices caulinares foi de 25°± 2°C, com fotoperíodo de 16h e irradiância de 36 µmol m⁻².s⁻¹.

2.2. Efeito da solução de carregamento na criopreservação de ápices de mangabeira

Os ápices caulinares (1 mm²) utilizados na criopreservação foram excisados de brotações de mangabeira multiplicadas *in vitro* com auxílio de um bisturi e um microscópio estereoscópico, em seguida foram submetidos a um pré-cultivo em meio WPM, suplementado 0,3 M de sacarose por 24 horas. Decorrido este intervalo, os ápices caulinares foram submetidos a diferentes tempos de exposição (20, 60, 90 e 120 minutos) à solução de carregamento composta de 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose dissolvido em meio Murashige e Skoog (1962), seguido ou não pela imersão em *plant vitrification solution 2* (PVS2) a 0°C, onde permaneceram por 15 minutos. A PVS2 é composta de 3,26 M de glicerol + 2,42 M de etileno glicol + 1,9 M de dimetilsufóxido + 0,4 M de sacarose, todos dissolvidos em meio MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

A criopreservação foi realizada conforme a técnica de *droplet vitrification* (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005) onde, antes da imersão em nitrogênio líquido (NL), os ápices foram acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 × 0,5 cm), sobre uma superfície gelada. Os ápices caulinares ficaram imersos no NL por, no mínimo 30 minutos, antes do descongelamento em uma solução de descarregamento composta de 0,4 M de sacarose dissolvido em meio MS. Todas as soluções tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram filtro-esterilizadas.

2.3 Comparação entre as técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação

2.3.1 *Droplet Vitrification*

Os ápices caulinares de mangabeira com cerca de 1,0 mm² foram excisados e imersos por 20 minutos, em solução de carregamento à temperatura ambiente. Em seguida, foi testada a imersão em PVS2 a 0°C, por diferentes intervalos de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos). Os ápices foram acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 × 0,5 cm) sobre uma superfície gelada antes da imersão em NL, onde permaneceram por 30 minutos. Após esse período, foi realizado o descongelamento por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de descarregamento.

2.3.1.1 Pré-cultivo em alta concentração de sacarose

O efeito do pré-cultivo dos ápices caulinares em meio WPM com 0,3 M de sacarose foi avaliado. Os ápices foram pré-cultivados por 24 horas, em seguida tratados com solução de carregamento por 20 minutos, antes da exposição ao PVS2 (0°C) por 15, 30, 45 e 60 minutos ou, pré-cultivados por 48 horas, em seguida tratados com solução de carregamento por 20 minutos, antes da exposição ao PVS2 (0°C) por 15 ou 30 minutos. Após o tratamento com PVS2, os ápices caulinares foram imersos em NL por 30 minutos e o descongelamento/descarregamento foi realizado em solução de descarregamento à temperatura ambiente por 15 minutos.

2.3.2 Vitrificação

A criopreservação dos ápices por vitrificação foi realizada conforme metodologia descrita por Charoensub et al. (2003). Ápices caulinares foram excisados e pré-cultivados por 24 horas em meio WPM com 0,3M sacarose. Decorrido o pré-cultivo, os explantes foram tratados com solução de carregamento por 20 minutos antes da exposição ao PVS2 (0°C) por 15, 30, 45 e 60 minutos. Os ápices foram transferidos para criotubos juntamente com 1,0 mL de PVS2 e imersos no NL, por 30 minutos. O descongelamento foi realizado em banho-maria (40°±2°C) por dois minutos. Após o descongelamento, a PVS2 foi rapidamente removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e substituída por 1,0 mL de solução de descarregamento à temperatura ambiente. O descarregamento ocorreu durante 15 minutos.

2.4 Pós-descongelamento

Após o descongelamento/descarregamento, os ápices caulinares foram inoculados e pós-cultivados por 24h, no escuro, em meio WPM com 0,3 M de sacarose, 20 ppm ácido ascórbico, 7 g L⁻¹ ágar e pH 5,8. Após esse período, os ápices foram transferidos para o meio WPM, acrescido de 8,87 µM BAP, 7 g L⁻¹ ágar, 20 ppm ácido ascórbico, 0,09M de sacarose e pH de 5,8. Os explantes foram mantidos por mais seis dias no escuro e então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16h por mais 21 dias, totalizando 30 dias de cultivo. Esse procedimento foi realizado para os experimentos de criopreservação descritos anteriormente e, para todos, foram avaliadas a retomada de crescimento dos ápices e a formação de calos.

Os ápices que sobreviveram ao processo de criopreservação, decorrida a primeira avaliação foram transferidos para tubos contendo o mesmo meio descrito acima e mantidos nas mesmas condições de crescimento.

2.5 Teste de meio de retomada de crescimento de ápices após a criopreservação

Neste experimento foi avaliado o efeito de diferentes composições de meio de cultura na fase de retomada de crescimento dos ápices caulinares de mangabeira criopreservados. A excisão dos ápices caulinares foi realizada conforme descrito anteriormente e os ápices foram pré e pós-cultivados, em meio WPM suplementado com 0,3 M de sacarose. O tempo de imersão em solução de carregamento foi de 20 minutos e o de imersão em PVS2 a 0°C foi de 30 minutos. Decorrido esses intervalos, os ápices foram imersos em NL, permanecendo por, no mínimo, 30 minutos. O descongelamento foi realizado em solução de descarregamento por 15 minutos. Após o pós-cultivo, foram testados dois meios (WPM, suplementado com 8,87 μM de BAP e 20 ppm de ácido ascórbico e 0,09 M de sacarose e WPM suplementado com 3,33 μM BAP, 0,27 μM ácido naftalenoacético (ANA), 100 ppm de ácido ascórbico, 800 ppm de polivinilpirrolidona e 0,09 M de sacarose, ambos tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram geleificados com 7 g L⁻¹ de ágar. Após 30 dias, foi avaliada a retomada de crescimento dos ápices caulinares.

2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Para testar o efeito da solução de carregamento foram utilizadas quatro repetições por tratamento, cada repetição contendo cinco ápices caulinares. Para o teste do tempo de exposição ao PVS2 (*droplet vitrification* ou vitrificação) foram utilizadas cinco repetições independentes por tratamento, cada uma composta por sete ápices criopreservados e três sem imersão no NL (controle). Os dados foram transformados através do arcosseno da porcentagem inicial.

Para o teste de regeneração de ápices caulinares criopreservados foram utilizadas quatro repetições com 10 ápices caulinares para cada tratamento.

Os dados foram submetidos à ANAVA e analisados por regressão, teste de Tukey ou pelo teste de t ($P \leq 0,05$), utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da solução de carregamento na criopreservação de ápices

A criopreservação de ápices de mangabeira apenas foi obtida com sucesso, quando se utilizou a PVS2 após o tratamento com a solução de carregamento. Os diferentes tempos de imersão à solução de carregamento, seguido pela imersão em PVS2 não afetaram a taxa de sobrevivência ou de retomada de crescimento dos ápices caulinares de mangabeira, apresentando média geral de 92,5% e 77%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Sobrevivência e retomada de crescimento de ápices caulinares de mangabeira criopreservados com diferentes tempos de exposição à solução de carregamento, antes da exposição ou não a PVS2 por 15 minutos.

Solução de carregamento (minutos)	PVS2	Sobrevivência (%)	Retomada de crescimento (%)
20	-	0 b	0 b
20	+	100 ± 0,0 a	78 ± 14,0 a
60	-	0 b	0 b
60	+	100 ± 0,0 a	80 ± 11,0 a
90	-	0 b	0 b
90	+	90 ± 5,0 a	85 ± 9,0 a
120	-	0 b	0 b
120	+	80 ± 11,0 a	65 ± 10,0 a

Médias (\pm erro padrão) com as mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

O emprego da solução de carregamento tem como efeito iniciar o processo de desidratação das células devido ao gradiente osmótico da solução. A exposição por diferentes períodos a essa solução também foi estudado por Panis, Piette e Swennen (2005), onde foi observado que a imersão por até sete horas não afetava a taxa de regeneração em bananeira. Porém, Takagi et al. (1997) observaram que para taro (*Colocasia esculenta* (L) Schott) existe uma forte queda na sobrevivência dos explantes criopreservados, a partir de 20 minutos de exposição à solução de carregamento.

Ainda de acordo com Takagi et al. (1997), a determinação do tempo adequado de imersão à solução de carregamento é necessária para que ocorra uma desidratação suficiente do explante e, ao mesmo tempo, uma diminuição dos efeitos deletérios causados pelo estresse osmótico e pela citotoxicidade das soluções. Esses fatores são determinantes para o sucesso da criopreservação.

A técnica de *droplet vitrification*, assim como outras técnicas baseadas na vitrificação, tem como ponto-chave a sobrevivência ao processo de desidratação pela solução de PVS2, resistindo ao congelamento rápido com pouca ou nenhuma redução adicional de sobrevivência. O pré-cultivo e a etapa

de carregamento podem influenciar na tolerância e exposição a PVS2 (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

3.2 Comparação entre as técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação

3.2.1 *Droplet vitrification* sem pré-cultivo dos ápices caulinares

Com relação à retomada de crescimento dos ápices caulinares sem pré-cultivo, em meio WPM com altas concentrações de sacarose, a interação “tempo de exposição ao PVS2 × tipo de explante (controle e ápices criopreservados)” foi significativa ($p= 0,00269$). Ápices não criopreservados apresentaram 100% de retomada de crescimento, após 15 e 30 minutos de exposição ao PVS2. Após a criopreservação, a redução na taxa de retomada de crescimento foi observada e, de acordo com o teste de regressão, a máxima taxa estimada de retomada de crescimento (81%) ocorreria aos 51 minutos de tratamento com o PVS2. Esse resultado é similar à média real (82%) observada aos 60 minutos de exposição ao PVS2. Entretanto, após 15 minutos de exposição ao PVS2, somente 45% dos ápices criopreservados retomaram o crescimento (Figura 1). A formação de calo nos explantes foi inferior a 4,6% e não houve diferença significativa ($p= 0,77$) entre os diferentes períodos de exposição à solução de vitrificação vegetal.

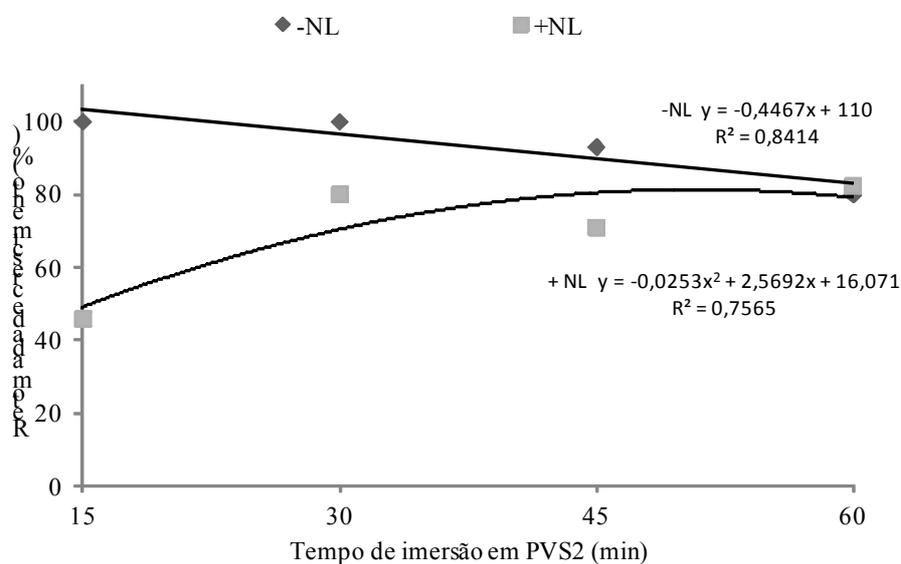


Figura 1 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices de mangabeira não imersos em nitrogênio líquido (- NL) ou criopreservados (+ NL) pela técnica de *droplet vitrification* sem pré-cultivo.

O tratamento com tempo de 15 minutos de exposição à solução de vitrificação não deve ter promovido uma desidratação e osmoproteção ideal, dessa forma células com alto conteúdo de água livre, quando expostas ao NL, podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização (MAZUR, 1984; SURANTHRAN et al., 2012). O uso da PVS2 permite não apenas a desidratação, essencial para evitar a cristalização da água, mas também promove efeitos coligativos de crioproteção e de redução na mobilidade de moléculas, permitindo que as células vitrifiquem durante a imersão no NL (VOLK; WALTERS, 2006).

3.2.2 Droplet vitrification com pré-cultivo dos ápices caulinares

O pré-cultivo dos ápices caulinares em 0,3 M de sacarose por 24 horas promoveu um aumento nas porcentagens de retomada de crescimento em todos os tempos de imersão em PVS2 testados para os explantes submetidos ao NL (Figura 2), quando comparados aos não pré-cultivados (Figura 1). A interação “tempo de exposição ao PVS2 × tipo de explante (controle x ápices criopreservados)” foi significativa ($p = 0,0079$). De acordo com a curva de regressão, ápices caulinares criopreservados apresentaram 90% de retomada de crescimento após 49 minutos de exposição ao PVS2 (Figura 2).

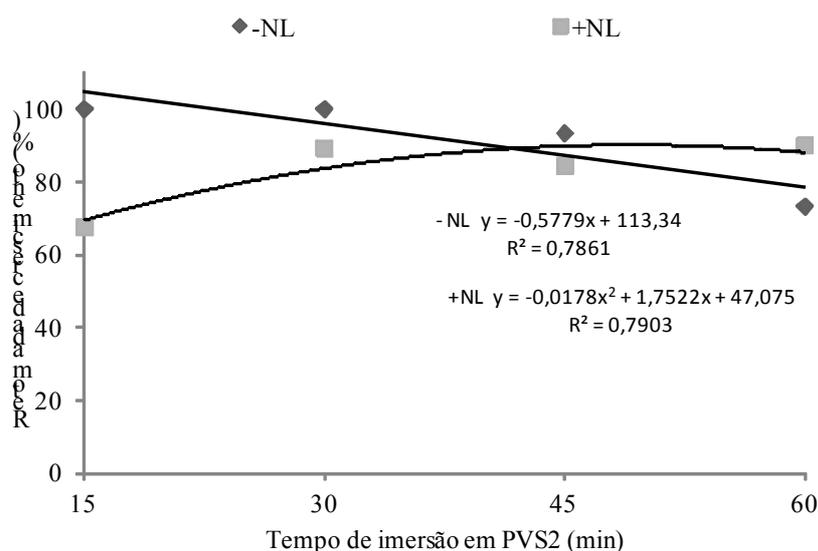


Figura 2 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices de mangabeira não imersos em nitrogênio líquido (- NL) ou criopreservados (+ NL) pela técnica de *droplet vitrification* após pré-cultivo por 24 horas, em meio com 0,3 M de sacarose.

A menor porcentagem de retomada de crescimento observada ocorreu nos explantes submetidos a 15 minutos de exposição ao PVS2 (67%, Figura 2). Esta porcentagem representa um incremento de 22% com relação aos explantes

não pré-cultivados em meio com 0,3 M de sacarose e expostos a PVS2 pelo mesmo período de tempo (Figura 1).

O incremento na sobrevivência dos explantes pode ser atribuído ao efeito benéfico da absorção de sacarose durante o pré-cultivo que promove tanto a redução do conteúdo de água dos explantes por desidratação (efeito osmótico) quanto a redução do ponto de congelamento da água presente nos tecidos (PANIS et al., 1996). Além disso, a sacarose aumenta a proteção das membranas celulares durante o resfriamento (CARPENTIER et al., 2010; QUAIN et al., 2009). De acordo com Burrit (2008), os açúcares solúveis, glicose e frutose, exercem um importante papel na estabilização da bicamada fosfolipídica e de proteínas em condições de baixas quantidades de água.

A formação de calo nos explantes pré-cultivados foi de 16% em média. Embora esse valor seja maior que o obtido para explantes não pré-cultivados (4,6%), não foi observada diferença estatística ($p = 0,56$) para os diferentes tempos de exposição ao PVS2.

A criopreservação de ápices caulinares pela técnica de vitrificação também necessita do uso de soluções constituídas por substâncias que promovam a osmoproteção. Além disso, a alta osmolaridade dessas soluções promovem uma desidratação severa do explante. Assim, o sucesso da criopreservação está ligado ao balanço hídrico nas células e ao uso de substâncias crioprotetoras (VOLK; WALTERS, 2006).

Crioprotetores podem ser tóxicos (FULLER, 2004) e as substâncias que compõem a PVS2, principalmente o DMSO, podem levar à morte celular, especialmente se a imersão ocorre em temperaturas superiores a 0°C ou se o período de exposição for muito prolongado (FULLER, 2004; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

Na tentativa de elevar a porcentagem de sobrevivência e, ao mesmo tempo, reduzir o período de tratamento com PVS2, ápices de mangabeira foram

pré-cultivados em meio com 0,3 M de sacarose por 48 horas e tratados por 15 ou 30 minutos com a PVS2. Entretanto, não houve diferenças significativas com relação à retomada de crescimento dos ápices após 48 horas de pré-cultivo. Explantes tratados com PVS2 por 15 minutos e pré-cultivados por 48 horas (Figura 3) apresentaram praticamente a mesma porcentagem de retomada de crescimento quando não foram submetidos ao pré-cultivo (Figura 1) enquanto que os ápices tratados por 30 minutos em PVS2 (Figura 3) apresentaram uma redução na retomada de crescimento de, aproximadamente, 30% quando comparado aos não pré-cultivados (Figura 1). A formação de calo nos explantes pré-cultivados por 48 horas em WPM contendo 0,3M de sacarose foi de cerca de 4%, não diferindo da porcentagem observada para explantes não pré-cultivados.

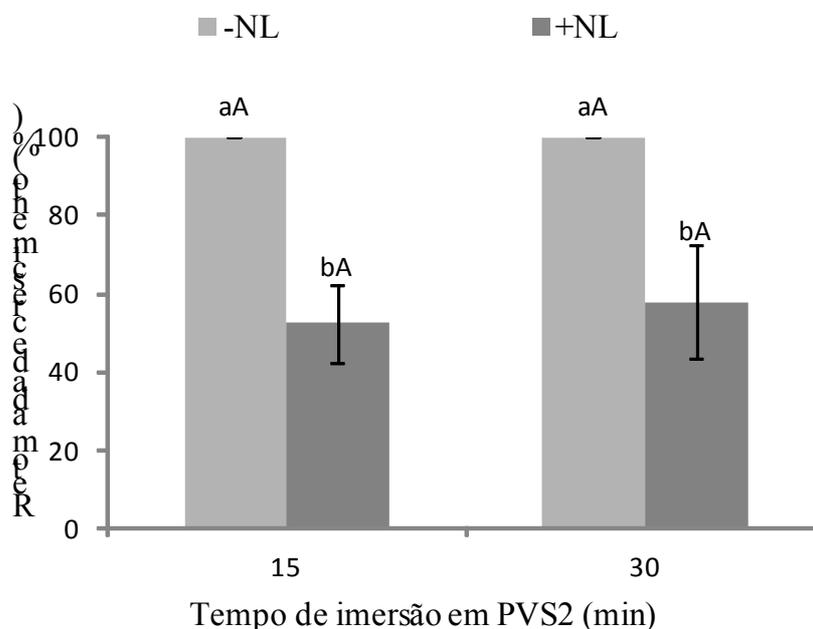


Figura 3 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices de mangabeira controle e criopreservados pela técnica *droplet vitrification* após pré-cultivo, em meio com 0,3M de sacarose por 48 horas. Letras maiúsculas são comparações entre diferentes períodos de exposição ao PVS2 para ápices caulinares imersos (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido. Letras minúsculas são comparações dentro de cada período de PVS2. Médias (\pm erro padrão) com a mesma letra, para cada tipo de comparação, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O choque osmótico provocado pelas soluções de carregamento, PVS2 e descarregamento utilizadas na criopreservação, principalmente pela longa exposição ao PVS2 somado ao efeito do pré-cultivo em alta concentração de sacarose, podem promover efeitos deletérios nos explantes (HALMAGYI; PINKER, 2006; RABA'A; SHIBLI; SHATNAWI, 2012). Essa redução da sobrevivência dos explantes após períodos maiores de pré-cultivo também foi observada por (COSTE et al., 2012; SHATNAWI; JOHSON, 2004).

Matsumoto, Sakai e Yamada (1994) observaram que plantas de wasabi pré-cultivadas por três dias em 0,3-0,7M de sacarose também apresentavam redução na sobrevivência após a criopreservação.

3.2.3 Vitrificação

Com relação à técnica clássica de vitrificação, foram observadas diferenças significativas na retomada de crescimento de ápices de mangabeira criopreservados, com relação ao tempo de exposição ao PVS2 ($p = 0,0001$). Usando-se a curva de regressão, foi possível estimar o máximo valor de retomada de crescimento, 74% aos 60 minutos de imersão em PVS2. A retomada de crescimento para os ápices não criopreservados não apresentou diferença significativa ($p=0,0665$) com média geral de 85% e apenas 7% dos ápices tratados com PVS2 por 15 minutos e criopreservados usando a técnica de vitrificação retomaram o crescimento após o descongelamento (Figura 4).

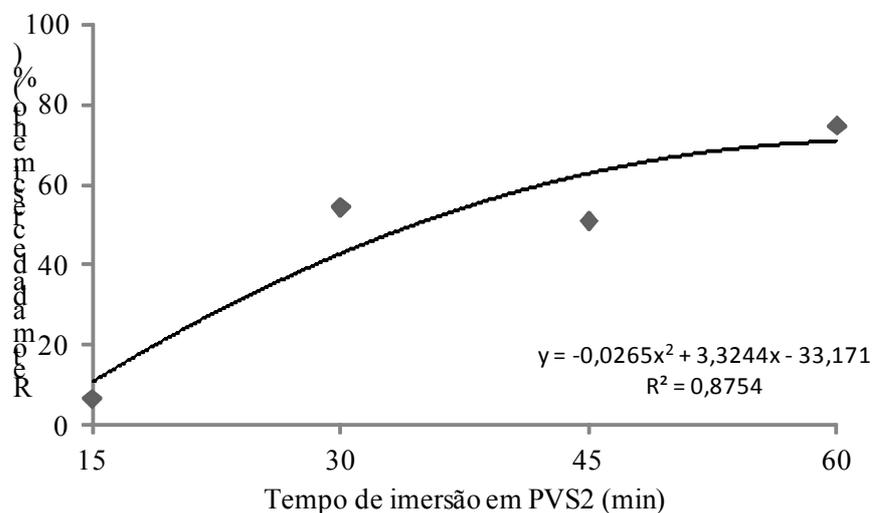


Figura 4 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices de mangabeira imersos em nitrogênio líquido pela técnica de vitrificação após pré-cultivo por 24 horas, em meio com 0,3 M de sacarose.

De maneira geral, as taxas de retomada de crescimento utilizando a vitrificação (Figura 4) foram inferiores às obtidas pela técnica de *droplet vitrification* (Figura 2). Esse baixo percentual de retomada de crescimento com períodos inferiores a 30 minutos de PVS2 também foi observado em ápices de *Carica papaya* L. criopreservados pela técnica de vitrificação (TSAI et al., 2009). Assim como na mangabeira, Chen et al. (2011) observaram que o método da *droplet vitrification* foi mais eficiente na criopreservação de lírio quando comparado à vitrificação.

Ao comparar as duas técnicas aplicadas, percebe-se que a principal diferença refere-se ao processo de descongelamento. *Droplet vitrification* e a vitrificação clássica envolvem taxas de congelamento ultrarrápida (PANIS et al., 2011; SAKAI; ENGELMAN, 2007) e rápida (MAZUR, 1984; PANIS; LAMBARDI, 2005), respectivamente. Desta forma, evitando-se a cristalização da água (MAZUR, 1984). Entretanto, o descongelamento na *droplet vitrification*

permite também um descongelamento ultrarrápido (CONDELLO et al., 2011; PANIS et al., 2011; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGELMAN, 2007), enquanto o método de vitrificação, permite apenas, um rápido reaquecimento.

A fase de descongelamento é um dos pontos críticos na criopreservação devido ao fenômeno da recristalização (HOPKINS et al., 2012). A recristalização pode ocorrer caso o descongelamento não seja rápido o suficiente para prevenir o fenômeno da agregação de pequenos cristais, levando ao crescimento do cristal de gelo. A formação de cristais de gelo geralmente promove danos celulares (GONZALEZ-ARNÃO et al., 2008; HOPKINS et al., 2012; MAZUR, 1984).

O aumento na porcentagem da retomada de crescimento dos ápices caulinares tratados com PVS2 por somente 15 minutos está diretamente relacionado com o pré-cultivo em 0,3 M de sacarose por 24 horas (Figura 1 e 2). Já para os explantes que foram pré-cultivados com a mesma concentração de sacarose e período de exposição na técnica de vitrificação apresentaram menores porcentagens de retomada de crescimento, entretanto, essa redução provavelmente não foi motivada pelas etapas anteriores ao congelamento, pois o congelamento é ultra-rápido (MAZUR, 1984; PANIS; LAMBARDI, 2005) e, também não está relacionado à excisão ou toxicidade, pois os controles (não inserido no nitrogênio líquido) exibiram elevadas taxas de retomada de crescimento (86%). A menor taxa de retomada de crescimento dos ápices de mangabeira criopreservados pela técnica de vitrificação pode ter sido influenciada pelo descongelamento mais lento e, conseqüentemente, pela recristalização.

O sucesso da aplicação da *droplet vitrification* em ápices de mangabeira, comprova o potencial dessa técnica para a criopreservação de uma variedade de espécies vegetais, como observado anteriormente para crisântemo (LEE et al.,

2011), lírio (CHEN et al., 2011), mamão (KAITY et al., 2008), banana (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005), entre outras. Com relação à vitrificação, existem protocolos para diversas espécies tropicais como mandioca (CHAROENSUB et al., 2003), citrus (AL-ABABNEH; KARAM; SHIBLI, 2002) entre outras.

Para as espécies nativas brasileiras, a maioria dos relatos referem-se à criopreservação de sementes ortodoxas (NOGUEIRA et al., 2011; PILLATTI et al., 2011). O desenvolvimento de protocolos de criopreservação utilizando a vitrificação e *droplet vitrification* pode contribuir efetivamente para a criopreservação de outras espécies nativas, principalmente aquelas que possuam sementes recalcitrantes. Como evidenciado nesse estudo, os ápices submetidos à criopreservação apresentaram altas porcentagens de retomada de crescimento e apresentaram desenvolvimento normal com emissão de novas folhas e aumento de tamanho (Figura 5).

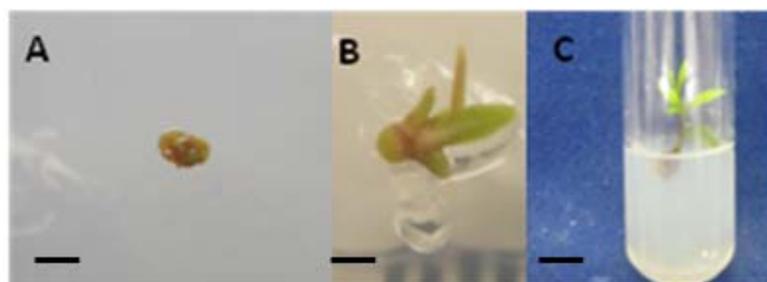


Figura 5 Ápices caulinares de *Hancornia speciosa* após a criopreservação pela técnica de *droplet vitrification*. Ápices caulinares com um dia (A), 30 dias (B) e 90 dias (C), após a criopreservação. Barras = 1 mm (A e B) e 1 cm (C).

3.3 Efeito do meio de cultivo na etapa pós-descongelamento

Foi observada uma diferença significativa na regeneração dos ápices caulinares ($p = 0,045$), com relação ao meio de cultivo empregado na etapa de

pós-descongelamento, a combinação de BAP e ANA, bem como a adição da polivinilpirrolidona juntamente com o ácido ascórbico permitiram uma maior retomada de crescimento (Figura 6).

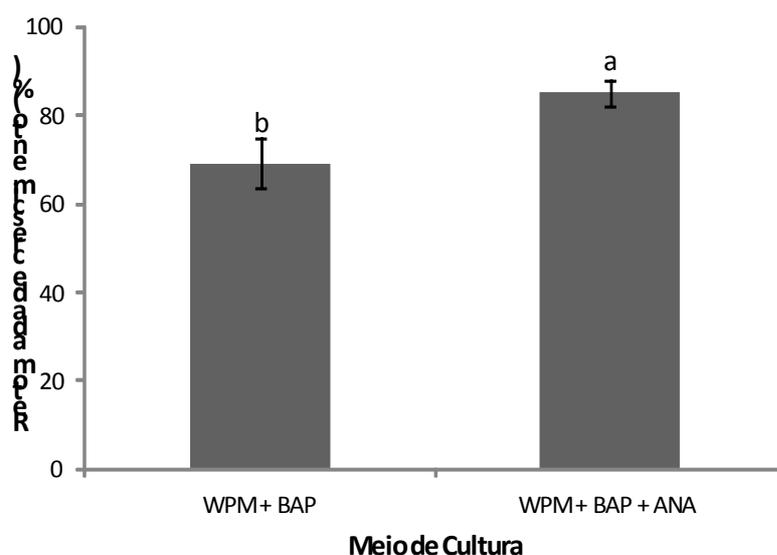


Figura 6 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices caulinares de mangabeira criopreservados e inoculados em diferentes meios de cultura. Médias (\pm erro padrão) com a mesma letra, para cada tipo de comparação, não diferem entre si, de acordo com o teste t ($P \leq 0,05$).

4 CONCLUSÕES

O tempo de imersão em solução de carregamento por 20 minutos com a posterior imersão em PVS2 por 15 minutos possibilita a criopreservação de ápices caulinares de mangabeira.

A utilização das técnicas da *droplet vitrification* e de vitrificação mostraram-se viáveis e podem ser utilizadas para a criopreservação de ápices caulinares de mangabeira.

O pré-cultivo dos ápices caulinares de mangabeira por 24 horas, em meio WPM com 0,3M de sacarose aumenta a sobrevivência dos explantes criopreservados pela técnica *droplet vitrification*.

O meio WPM acrescido de 3,33 μ M de BAP, 0,27 μ M de ANA, 100 ppm de ácido ascórbico e 800 ppm de polivinilpirrolidona pode ser empregado na fase de cultivo dos ápices caulinares após a criopreservação.

REFERÊNCIAS

AL-ABABNEH, S. S.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Oxon, v. 38, n. 6, p. 602-607, Nov./Dec. 2002.

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. ***Scientia Horticulturae***, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 320-324, Aug. 2011.

BURRITT, D. J. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 209-215, Nov. 2008.

CARPENTIER, S. C. et al. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems. ***Journal of proteome Research***, Washington, v. 9, n. 10, p. 5038-5049, Oct. 2010.

CASTILLO, N. R. F. et al. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, New York, v. 46, n. 3, p. 246-256, June 2010.

CEJAS, I. et al. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. ***Plant Cell Reports***, New York, v. 31, n. 11, p. 2065-2073, Nov. 2012.

CHAROENSUB, R. et al. Routine cryopreservation of *in vitro*-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. ***Scientia Horticulturae***, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 485-492, Sept. 2003.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.

CONDELLO, E. et al. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. **CryoLetters**, London, v. 32, n. 2, p. 175-185, Mar./Apr. 2011.

COSTE, A. et al. *In vitro* propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 213-226, Aug. 2012.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, n. 3, p. 227-243, Sept. 1991.

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

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

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

GONZALEZ-ARNÃO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

HALMAGYI, A.; PINKER, I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 145-153, Feb. 2006.

HOPKINS, J. B. et al. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. **Cryobiology**, San Diego, v. 65, n. 3, p. 169-178, Dec. 2012.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KAITY, A. et al. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1529-1539, Sept. 2008.

LATA, H. et al. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 46, n. 1, p. 22-27, Feb. 2010.

LEE, Y. G. et al. Improved cryopreservation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification. **Cryoletters**, London, v. 32, n. 6, p. 487-497, Nov./Dec. 2011.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 11, p. 614-621, Nov. 2009.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, May/June 1980.

MARINHO, D. G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 530-537, Apr. 2011.

MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 8, p. 442-446, May 1994.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3, p. c125-c142, Sept. 1984.

MOURA, N. F. et al. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 473-481, May/June 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, Jan. 1962.

NOGUEIRA, G. F. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* A. JUSS. embryos using different moisture contents. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 908, n. 1, p. 199-202, Apr. 2011.

PANIS, B. et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, Clare, v. 121, n. 1 p. 95-106, Nov. 1996.

_____. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 908, n. 1, p. 157-164, Jan. 2011.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 43-54, Mar. 2005.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PATEÑA, L. F.; BARBA, R. C. The development of techniques for tissue culture of mango (*Mangifera indica* L.) var. Carabao and successful transfer of *ex vitro*-grafted plants to soil and the field. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 47, n. 5, p. 629-636, Oct. 2011.

PEREIRA, A. B. D. et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with *p*-toluenesulfonyl chloride. ***Journal of Chromatography B***, Amsterdam, v. 887, n. 1, p. 133-137, Mar. 2012.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 47, n. 2, p. 82-98, Feb. 2011.

QUAIN, M. D. et al. Sucrose treatment and explant water content: critical factors to consider in development of successful cryopreservation protocols for shoot tip explants of the tropical species *Diocores rotundata* (Yam). ***CryoLetters***, London, v. 30, n. 3, p. 212-223, May/June 2009.

RABA'A, M. M.; SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, M. A. Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 110, v. 3, p. 371-382, Sept. 2012.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 47, n. 1, p. 1-4, July/Aug. 2011.

SÁ, A. J. et al. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 36, n. 4, p. 406-414, jul./ago. 2012.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, jan. 2011.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. **Cryo-Letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Criopreservação de nucellar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n. 1, p. 30-33, June 1990.

SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, Jan. 2008.

SANTOS, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul./set. 2011.

SHATNAWI, M. A.; JOHNSON, A. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of 'christmas bush' (*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 2, p. 239-244, Mar./Apr. 2004.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1847-1852, mar. 2009.

_____. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev. 2011.

SURANTHRAN, P. et al. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulator**, Dordrecht, v. 66, n. 2, p. 101-109, Mar. 2012.

TAKAGI, H. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification: I., investigation of basic conditions of the vitrification procedure. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 9, p. 594-599, June 1997.

TSAI, S. F. et al. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic papaya lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 157-164, Aug. 2009.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 48-61, Feb. 2006.