



DÉBORA DE OLIVEIRA PRUDENTE

**ORGANOGENESE INDIRETA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS
E DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE
MANGABEIRA**

LAVRAS – MG

2014

DÉBORA DE OLIVEIRA PRUDENTE

**ORGANOGÊNESE INDIRETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS
LATERAIS E DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE MANGABEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Renato Paiva, Ph.D.

Coorientadores:

Dr. Luciano Coutinho Silva

Dr^a. Fernanda Carlota Nery

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Prudente, Débora de Oliveira.

Organogênese indireta e criopreservação de gemas laterais e de unidades encapsuláveis de mangabeira / Débora de Oliveira Prudente. – Lavras : UFLA, 2014.

96 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. *Hancornia* sp. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3. Criopreservação. 4. Apocynaceae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.72041

DÉBORA DE OLIVEIRA PRUDENTE

**ORGANOGÊNESE INDIRETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS
LATERAIS E DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE MANGABEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 01 de agosto de 2014.

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Cristina Stein UFG

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS – MG

2014

A minha avó Mariana, por ser o meu maior exemplo de humildade e carinho.

Aos meus pais e irmã, por serem minha base, estrutura e força.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sebastião e Lúcia, que são a razão de tudo, principalmente pelo apoio, carinho e amor incondicional em toda minha caminhada, e a minha irmã Daniela, pelos momentos de cumplicidade.

Ao meu namorado Wesley, por todo companheirismo, amizade e paciência em todos os momentos, principalmente nos mais árduos. Muito obrigada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Renato Paiva, pelo exemplo de profissionalismo, pelos conselhos e por todo apoio e confiança no meu trabalho.

À minha coorientadora e grande amiga Fernanda Carlota Nery, por ter me introduzido na pesquisa científica, ter acreditado no meu potencial e apoiado as minhas escolhas.

Ao meu coorientador Luciano Coutinho Silva, por toda ajuda, incentivo e estímulo. Sem você, o resultado não seria o mesmo.

A minha amiga Débora Domiciano, pela grande amizade que construímos, por todas as horas de estudo, conversas e conselhos.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) e do Programa de Fisiologia Vegetal, pelo convívio e por todos os momentos compartilhados de trabalho e diversão. Vocês foram essenciais nessa conquista.

Aos meus amigos de Barbacena e de graduação em Ciências Biológicas, os quais fizeram parte direta ou indiretamente dessa conquista.

A toda minha família e, em especial, a minha avó Mariana que sempre acreditou no meu potencial e na minha capacidade, dando incentivo e carinho, essa conquista também é de vocês.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

DÉBORA DE OLIVEIRA PRUDENTE, filha de Sebastião Prudente e Maria Lúcia de Oliveira Prudente, nasceu em 07 de novembro de 1990 em Barbacena – MG. cursou o ensino fundamental na Escola Municipal Abgar Renault e o ensino médio no Instituto Tenente Ferreira, concluindo o segundo grau em 2008. Em março de 2009, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de São João Del Rei, finalizando em abril de 2013. Neste período, foi monitora das disciplinas de Fisiologia Vegetal e Anatomia Vegetal e desenvolveu projetos de pesquisa, sob orientação da Prof^ª. Fernanda Carlota Nery, como bolsista de iniciação científica do CNPq. Em maio de 2013, iniciou o curso de mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na UFLA, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies nativas do Cerrado, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, Ph.D, concluindo-o em agosto de 2014.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Straus

RESUMO GERAL

Mangabeira é uma espécie nativa do Brasil e apresenta grande potencial econômico, porém a porcentagem de germinação das sementes é baixa, e apresenta recalcitrância, o que reduz a produtividade da espécie, influenciando na manutenção e conservação do material vegetal. Objetivou-se: obter plântulas via organogênese indireta, bem como, criopreservar gemas laterais utilizando as técnicas de *droplet vitrification* e encapsulamento-vitrificação. Para a organogênese indireta, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes reguladores de crescimento: 2,4-D (0,0; 2,46; 7,38; 12,3 17,22 μM), BAP (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM) e TDZ (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM). A regeneração das brotações foi realizada em meio de cultivo WPM, acrescido de cinetina em combinação com 2,4-D (0,0 + 0,0; 5,0 + 0,0 e 5,0 + 7,38 μM). Para o enraizamento as brotações foram submetidas a tratamentos com diferentes auxinas AIB, ANA e AIA. Para a criopreservação, gemas laterais foram inoculadas em meio de cultivo WPM com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM), GA_3 (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) e 0,25 μM de BAP combinado com GA_3 (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM). As gemas foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas) na ausência de luz. Após o pré-cultivo, as gemas foram imersas em PVS2 a 0 °C por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) e posteriormente, submetidas a técnica *droplet vitrification*. O encapsulamento de gemas laterais foi obtido em matriz de alginato, na presença ou ausência de BAP (0,0 ou 0,2 μM). As cápsulas foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM líquido, acrescido com diferentes concentrações de sacarose (0,3, 0,75 e 1 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas). As cápsulas foram submetidas à desidratação em sílica gel ou fluxo laminar por 0, 1, 2 e 3 horas antes da imersão em PVS2 a 0 °C por diferentes períodos. A maior porcentagem de número de brotos (72,86%) foi obtida na concentração de 7,38 μM de 2,4-D. Foi obtida maior regeneração de brotos com a combinação de 5 μM de cinetina + 7,38 μM de 2,4-D. As brotações apresentaram maior porcentagem de enraizamento (80%) no tratamento com ANA e AIB. O pré-cultivo em 0,1 M de prolina por 24 horas promoveu um aumento na porcentagem de sobrevivência (83,33%). A utilização da PVS2 por 15 minutos promoveu maiores taxas de sobrevivência (78%). Gemas laterais encapsuladas na presença de 0,2 μM de BAP (86%) e pré-cultivadas em 0,75 M de sacarose por 24 horas, associado com a desidratação em câmara de fluxo por 1 hora, obtiveram maiores taxas de regeneração. A criopreservação de gemas laterais encapsuladas foi obtida com sucesso com o uso de PVS2 por 15 minutos.

Palavras-chave: *Hancornia* sp. Cultura de tecidos vegetais. Criopreservação. Apocynaceae.

GENERAL ABSTRACT

Mangabeira is a species native to Brazil and has great economic potential, but the percentage of seed germination is low, and presents recalcitrance, which reduces the productivity of the species, influencing the maintenance and upkeep of the plant material. Aimed to: obtain seedlings via indirect organogenesis, as well as lateral buds using cryopreservation techniques droplet vitrification and encapsulation-vitrification. For indirect organogenesis, nodal segments were inoculated in culture medium WPM supplemented with different growth regulators: 2,4-D (0.0, 2.46, 7.38, 12.3 17.22 μM), BAP (0.0, 4.92, 9.84, 14.76 and 19.68 μM) and TDZ (0.0, 4.92, 9.84, 14.76 and 19.68 μM). Regeneration of shoots was performed in culture medium WPM plus kinetin in combination with 2,4-D (0.0 + 0.0, 5.0 + 0.0 and 5.0 + 7.38 μM). For rooting shoots were subjected to treatments with different auxins AIB, ANA and AIA. For cryopreservation, lateral buds were inoculated in WPM culture medium with different concentrations of BAP (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM), GA3 (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM) and 0.25 μM of BAP in combination with GA3 (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM). Buds were pre-grown in culture medium WPM with different concentrations of proline (0.0, 0.1, 0.2 and 0.3 M) for different times (24 and 48 hours) in the absence of light. After the pre-cultivation the shoots were immersed in PVS2 at 0 ° C for different times (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) and subsequently subjected to droplet vitrification technique. The encapsulation of lateral buds were obtained in the alginate matrix, the presence or absence of BAP (0.0 or 0.2 μM). The capsules were pre-cultured in liquid culture medium WPM, together with different concentrations of sucrose (0.3, 0.75 and 1 M) for different times (24 and 48 hours). The capsules were subjected to dehydration silica gel or laminar flow with 0, 1, 2 and 3 hours before immersion in PVS2 at 0 ° C for different periods. The highest percentage of number of shoots (72.86%) was obtained at a concentration of 7.38 μM of 2,4-D. Increased shoot regeneration with the combination of kinetin + 5 μM 7.38 μM of 2,4-D was obtained. Shoots showed higher rooting percentage (80%) on treatment with ANA and AIB. The preculture in 0.1 M proline for 24 hours promoted an increase in survival percentage (83.33%). The use of PVS2 for 15 minutes showed higher survival rates (78%). Lateral buds encapsulated in the presence of 0.2 μM of BAP (86%) and pre-cultured in 0.75M sucrose for 24 hours, dehydration associated with the flow chamber for 1 hour, had higher regenerating rate. Cryopreservation of lateral buds encapsulated was successfully obtained using PVS2 for 15 minutes.

Key-words: *Hancornia* sp., Plant tissue culture, Cryopreservation, Apocynaceae.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	16
2.2 Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i>	17
2.3 Unidades encapsuláveis	19
2.4 Criopreservação	20
2.4.1 Crioprotetores	23
2.4.2 Adaptações nas técnicas de criopreservação	24
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE	33
ARTIGO 1 - ORGANOGÊNESE INDIRETA DE MANGABEIRA	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Organogênese indireta a partir de segmentos nodais	41
2.2 Regeneração <i>in vitro</i> das brotações	41
2.3 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações	42
2.4 Análises Estatísticas	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Organogênese indireta a partir de segmentos nodais	44
3.2 Regeneração <i>in vitro</i> das brotações	48
3.3 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações	51
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ARTIGO 2 - CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS E DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE MANGABEIRA	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Regeneração de gemas laterais	68
2.2 Pré-cultivo de gemas laterais	68
2.3 <i>Droplet vitrification</i>	69
2.4 Encapsulamento de gemas laterais.....	70
2.5 Encapsulamento-desidratação	70
2.6 Encapsulamento-vitrificação	71
2.7 Estatística.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1 Regeneração de gemas laterais	73
3.2 Pré-cultivo de gemas laterais	76
3.3 <i>Droplet vitrification</i>	78

3.4 Encapsulamento de gemas laterais.....	80
3.5 Encapsulamento-desidratação.....	83
3.6 Encapsulamento-vitrificação	86
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	89

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie frutífera que apresenta uma ampla distribuição geográfica, desde o estado do Amapá até o estado de São Paulo. Pertence à família Apocynaceae e à classe Dicotyledoneae (MACHADO et al., 2004). Possui um grande potencial econômico devido às diversas possibilidades de aproveitamento de seus frutos para o consumo *in natura*, produção de xaropes, sucos, doces, sorvetes e compotas (SOARES et al., 2011).

Os frutos se encontram em fase de domesticação para cultivos comerciais, sendo alvo principalmente de exploração extrativista (LÉDO et al., 2007). Logo, diversos aspectos de seu desenvolvimento necessitam de maiores estudos visando a uma maior produção, podendo-se destacar a propagação vegetativa e a seleção de genótipos promissores. Além de explorar metodologias de armazenamento de germoplasma em longo prazo, quesito de vital importância uma vez que a porcentagem de germinação de sementes de mangabeira é baixa devido à presença de inibidores na polpa dos frutos, mas principalmente, pelo fato desta espécie apresentar sementes recalcitrantes, o que também inviabiliza o armazenamento das sementes de forma convencional (OLIVEIRA; VALIO, 1992; LORENZI, 2000; BARROS et al., 2006).

Com relação à propagação vegetativa, existem vários estudos publicados sobre a regeneração e enraizamento *in vitro* de mangabeira (PINHEIRO et al., 2001; LÉDO et al., 2007; SOARES et al., 2009; SOARES et al., 2011; SÁ et al., 2012; SARTOR et al., 2012). No entanto, mesmo com alguns avanços, faltam estudos sobre o potencial de regeneração de plantas a partir de organogênese indireta.

A organogênese indireta envolve uma variedade de sequências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação experimental de partes de uma planta, culminando com a formação de calos e o posterior desenvolvimento de primórdios de órgãos ou plantas inteiras (HICKS, 1980;

RESENDE et al., 2008). Apontada como uma excelente alternativa para a propagação vegetativa, a organogênese indireta serve também como subsídio para programas de transformação, os quais dependem de protocolos bem estabelecidos para regeneração do material transformado (CRUZ et al., 2013). Contribui também para a maximização da produção de compostos secundários da espécie, onde é necessário selecionar e estabelecer diferentes linhagens de calos de acordo com a sua competência celular para garantir uma produção eficiente do metabólito de interesse (FUMAGALI et al., 2008). Uma vez que foi demonstrado em estudos *in vitro* que a mangabeira tem constituintes com potencial anti-hipertensivo, com grande capacidade para serem explorados (SERRA et al., 2005).

Outra técnica que visa à regeneração e produção em larga escala de mudas de mangabeira é a produção de unidades encapsuláveis, com importante aplicação em trabalhos de micropropagação e conservação *in vitro* de germoplasma (PEREIRA et al., 2008), principalmente para frutíferas que apresentam sementes sensíveis à dessecação, como é o caso da mangabeira (RAI et al., 2009). Essa técnica consiste no encapsulamento de embriões somáticos, ápices caulinares ou gemas laterais em uma matriz de alginato (YUGAR et al., 2009). Possui amplo uso na conservação, pois os explantes ficam completamente envolvidos e protegidos, facilitando o manuseio e possibilitando o intercâmbio de material genético e armazenamento em curto e em longo prazo.

Com relação ao armazenamento de germoplasma em longo prazo, as unidades encapsuláveis podem passar por técnicas de criopreservação, que consistem em conservar material biológico vivo por período indeterminado a ultra-baixas temperaturas (-196 °C), sem que este perca sua viabilidade (ENGELMANN, 2011). Algumas técnicas de criopreservação para unidades encapsuláveis foram descritas por Panis et al. (2001). Dentre elas, a técnica de encapsulamento-desidratação, em que os explantes são encapsulados em matriz de alginato, pré-cultivados em um meio de cultivo contendo altas concentrações de sacarose, posteriormente desidratados e imersos em

nitrogênio líquido (NL) e também a técnica de encapsulamento-vitrificação, que imerge as cápsulas diretamente em NL sem uma prévia desidratação. Estas técnicas têm se mostrado com alta aplicabilidade para explantes com tamanho reduzido, e sensíveis ao processo de criopreservação convencional, como é o caso dos meristemas. Entretanto, o sucesso das técnicas de criopreservação para unidades encapsuláveis depende de estudos acerca do tipo de explante, constituição e consistência da cápsula e, principalmente, condições de cultivo *in vitro* para posterior regeneração do material (RAI et al., 2009).

Os explantes também podem ser criopreservados diretamente, utilizando-se técnicas com a aplicação de crioprotetores, a fim de evitar danos às estruturas celulares. Uma técnica atual e muito difundida é a *droplet vitrification*, uma adaptação da vitrificação convencional, em que os explantes são posicionados sobre uma folha de papel alumínio e imersos em NL (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Um dos pontos-chave é que na *droplet vitrification* o reaquecimento é ultrarrápido, reduzindo o fenômeno da recristalização da água em cristais grandes, o que causaria a ruptura das células (PANIS et al., 2001).

Diante disso, o sucesso da utilização da criopreservação para novas espécies depende da otimização dos protocolos existentes, e principalmente adaptação das etapas de pré-cultivo/carregamento, crioproteção das células antes da imersão em NL, reaquecimento, descarregamento celular e regeneração dos explantes (GANINO et al., 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Hancornia speciosa* Gomes

Hancornia speciosa Gomes, conhecida popularmente como mangabeira, pertence à família Apocynaceae e à classe Dicotyledoneae (MACHADO et al., 2004). 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 perene, com porte variando de 4 a 7 metros de altura, podendo chegar até 15 metros. Todas as partes da planta exsudam látex de cor branca ou róseo-pálida, empregado na medicina popular para o tratamento de combate à tuberculose, estimulante das funções hepáticas (uso interno), tratamento de dermatoses e verrugas, (SOUZA et al., 2005) e também contra inflamações, úlceras e herpes (MOURA; AGRA, 1989; SILVA JÚNIOR, 2004).

O fruto é uma baga elipsoide e carnosa, com número de sementes variável, coloração amarela ou esverdeada, diâmetro médio de 3,4 cm e comprimento médio de 3,7 cm (GANGA et al., 2010) e peso variando de 15 g a 102,8 g (SALOMÃO; SANTOS; MUNDIM, 2004). Os frutos são ricos em ferro e em vitaminas importantes, como a vitamina C (SILVA JÚNIOR, 2004). As sementes são discoides, com hilo central, achatadas, de coloração castanho-claro e rugosas, apresentando de duas a 15 sementes por fruto (SOUSA et al., 2005). A porcentagem de germinação de sementes de mangabeira é baixa, devido à presença de inibidores na polpa que realizam fermentação e produzem compostos fenólicos que atuam inibindo a germinação, além de apresentarem recalcitrância, não podendo ser armazenadas por longos períodos (OLIVEIRA & VALIO, 1992; LORENZI, 2000; BARROS et al., 2006).

No Brasil, a mangabeira apresenta 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 baixadas litorâneas e de cerrado (MACHADO et al., 2004). No cerrado, a expansão da agricultura, o manejo inadequado dessas áreas, desmatamento e o extrativismo predatório ocasionam grandes danos a esse bioma (MACHADO et al., 2004; PINHAL et al., 2011) e conseqüentemente, às populações de mangabeira, comprometendo a dispersão natural de frutos (MOTA et al., 2008). Embora boa parte da planta apresente grande potencial econômico, devido às diversas possibilidades de aproveitamento de seus frutos (SOARES et al., 2011), a maior parte da comercialização dos frutos é oriunda do extrativismo (MOTA et al., 2008) com poucos plantios tecnificados em escala comercial (SANTOS, 2013).

Diante do exposto, o conhecimento e desenvolvimento de técnicas de propagação *in vitro* são de grande importância para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento (LÉDO et al., 2007). Entretanto, diversos aspectos da propagação *in vitro* de mangabeira necessitam de maiores estudos, podendo-se destacar a seleção de genótipos promissores, a propagação vegetativa via organogênese indireta e o armazenamento de germoplasma em longo prazo (SANTOS, 2013).

2.2 Multiplicação e enraizamento *in vitro*

Dentre as principais formas de propagação assexuada, destaca-se a micropropagação, técnica do cultivo *in vitro* de plantas, utilizada comercialmente, permitindo que uma planta com características desejáveis possa ser multiplicada em larga escala e em um curto espaço de tempo (ULISSES et al., 2010). Apresenta vantagens como a boa qualidade fisiológica e fitossanitária das mudas produzidas, que é de fundamental importância para uma produção em escala comercial, além de garantir a

homogeneidade, rápida formação e alta produtividade das mudas (MELETTI, 2000; FRANCO et al., 2008). Apesar disso, o nível de conhecimento sobre o emprego dessa técnica para a maioria das espécies nativas ainda é incipiente, pois muitas plantas encontram-se em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (PINHAL et al., 2011).

As espécies lenhosas, que contemplam grande parte das frutíferas, geralmente apresentam dificuldades de propagação sexuada, por possuírem, em sua maioria, sementes recalcitrantes (ERIG; SCHUCH, 2003). Dessa forma, são essenciais os estudos visando o aperfeiçoamento de técnicas de propagação assexuada para multiplicação em larga escala de espécies nativas com aplicação em plantios homogêneos. Para tanto, dentro da micropropagação, a organogênese e a embriogênese somática visam a otimização da produção *in vitro* utilizando células e tecidos vegetais como fonte de explante.

A organogênese *in vitro* leva à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está frequentemente conectado com o tecido de origem, ocorrendo indiretamente a partir da regeneração de calos, ou diretamente a partir da multiplicação de brotos nas células do explante original (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Em geral, são reconhecidas três fases da organogênese. Na primeira fase, as células do explante adquirem competência, a qual é definida como a habilidade de responder a sinais hormonais de indução de órgãos. A segunda fase é referida como desdiferenciação, quando ocorre o processo de aquisição da competência organogênica. Já na terceira fase, a morfogênese ocorre independentemente dos estímulos exógenos, determinando a formação de um órgão específico (SUGIYAMA, 1999). Outros fatores também estão direta ou indiretamente envolvidos com o sucesso da morfogênese *in vitro*, como por exemplo: o tipo de explante, o balanço de fitorreguladores, a disponibilidade de nutrientes, as condições ambientais nas

quais se dá o cultivo, os fatores genéticos, entre outros (TREVISAM et al., 2011).

De modo geral, após a multiplicação da cultura *in vitro*, principalmente após o processo organogênico e o estabelecimento de brotações, as espécies lenhosas apresentam maiores dificuldades para o enraizamento adventício que depende da interação de muitos fatores fisiológicos e bioquímicos, além da variação relacionada aos diferentes genótipos (OLIVEIRA et al., 2013). As respostas à aplicação dos reguladores de crescimento variam de acordo com a espécie cultivada, bem como com as classes hormonais e concentrações utilizadas (PINHAL et al., 2011). O enraizamento *in vitro* é essencial, pois visa à obtenção de plantas completas para posterior transplante e aclimatização para as condições *ex vitro* (MANTOVANI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007).

As principais etapas do enraizamento são: a desdiferenciação, na qual as células tornam-se competentes para a resposta rizogênica à auxina. A indução da formação meristemoide, fase em que algumas células, pela ação da auxina, tornam-se determinadas para a formação de raízes. E a diferenciação, em que não é mais necessária a sinalização celular da auxina, e o primórdio radicular do qual irá se desenvolver a raiz adventícia é formado (KLERK, 2002). Assim, após caracterizar a via de regeneração, podem-se estabelecer melhores condições de cultivo para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e obtenção de plantas.

2.3 Unidades encapsuláveis

Para minimizar problemas como a dificuldade de germinação e de armazenamento de sementes recalcitrantes, pode-se utilizar uma técnica da cultura de tecidos que consiste no encapsulamento de embriões somáticos, ápices caulinares ou gemas laterais em uma matriz de alginato (YUGAR et al., 2009). A maioria das espécies frutíferas apresenta sementes sensíveis à dessecação e o interesse em usar a tecnologia de encapsulamento tem

aumentado continuamente (RAI et al., 2009). Além de possuírem um amplo uso na conservação, pois os explantes ficam completamente envolvidos e protegidos facilitando o manuseio e possibilitando ainda o intercâmbio de material genético, manutenção da identidade clonal, independência de efeitos sazonais e armazenamento em curto e em longo prazo (RAI et al., 2009).

Com relação ao armazenamento em longo prazo, principalmente para meristemas, os quais possuem dimensões reduzidas, o encapsulamento proporciona facilidade no manuseio e proteção às estruturas que serão imersas em NL, contra os possíveis danos causados pelo resfriamento tornando-os mais resistentes a tratamentos que poderiam ser letais (PAULET et al., 1993; BACHIRI et al., 1995; SANTOS, 2004).

Técnicas que envolvem a criopreservação de meristemas encapsulados possuem alta aplicabilidade, entretanto, estudos acerca da constituição e consistência da cápsula, condições de cultivo e técnica de armazenamento das unidades encapsuláveis são necessários, para garantir porcentagens elevadas de regeneração após as etapas de criopreservação (SANTOS, 2000). Para mangabeira, a utilização de gemas laterais para a produção de unidades encapsuláveis representa uma alternativa para a propagação *in vitro* em larga escala e posterior armazenamento em longo prazo.

2.4 Criopreservação

A conservação *in vitro* consiste na manutenção de material biológico vivo em condições assépticas e pode ser realizada em médio ou em longo prazo. Na conservação em médio prazo, destaca-se a técnica de crescimento lento, na qual, propágulos são mantidos em temperaturas reduzidas (5 °C - 15 °C), com baixa intensidade luminosa e meio de cultura com agentes osmóticos (LÉDO et al., 2014). Já para a conservação em longo prazo, destaca-se a criopreservação, que consiste em conservar material biológico

vivo em ultrabaixa temperatura (-196 °C). Essa ultrabaixa 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 (ENGELMANN, 2011).

A criopreservação pode ser aplicada para a conservação de diferentes tipos de explantes: protoplastos, suspensões celulares, calos embriogênicos, ápices caulinares, gemas laterais, sementes, embriões zigóticos e somáticos (BENSON, 2008). As coleções são mantidas em pequenos espaços, permanecem protegidas de contaminação e requerem manutenção mínima (ENGELMANN, 2004). Além disso, o custo do armazenamento em um banco criogênico requer um aporte financeiro menor ao longo dos anos quando 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 (ENGELMANN, 2004; SANTOS, 2004; DULLOO et al., 2009).

Dentre as principais técnicas de criopreservação podem-se citar: o resfriamento lento, caracterizado pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e pela redução gradual da temperatura, controlada por um freezer programável (MUKAIDA et al., 2003; NAIK et al., 2005); o encapsulamento-desidratação, em que os explantes são encapsulados em matriz de alginato, pré-cultivados em um meio contendo altas concentrações de sacarose, desidratados pela exposição ao ar na câmara de fluxo laminar ou a secagem num recipiente contendo sílica gel, reduzindo o teor de água para 20% a 30%, seguido de uma rápida imersão em NL, na sequência, o reaquecimento é realizado em banho-maria a 40 °C por 1 a 3 minutos (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; PANIS; LAMBARDI, 2005); a técnica clássica de vitrificação, que se baseia no incremento da viscosidade da solução utilizando soluções crioprotetoras altamente concentradas, seguido pelo resfriamento ultrarrápido dos explantes, ocorrendo a solidificação sem cristalização (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005;

PANIS; LAMBARDI, 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007; KAVIANI, 2011); o encapsulamento-vitrificação, uma combinação de encapsulamento-desidratação e métodos de vitrificação, em que os explantes são encapsulados em uma matriz de alginato, transferidos para criotubos e expostos às soluções crioprotetoras, congelados rapidamente em NL, reaquecidos em banho-maria e expostos a uma solução de descarregamento antes da inoculação em meio de crescimento, necessária para iniciar o processo de desidratação das células devido ao seu gradiente osmótico (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Para o sucesso da criopreservação é essencial evitar a formação de cristais de gelo no meio intracelular, sendo a temperatura entre -15 °C 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 reaquecimento (MAZUR, 1984).

A prevenção da formação de cristais de gelo pode ser obtida por meio de um resfriamento rápido, o que promove a vitrificação. A vitrificação é definida como a transição direta da água do estado líquido para um estado sólido amorfo ou vítreo (ENGELMANN, 2011). 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 reaquecimento. Nessa etapa, pode haver formação de grandes cristais de gelo quando este começa a passar do estado vitrificado para o estado líquido, caracterizando a recristalização (MAZUR, 1984). Para evitar a recristalização, o material deve ser retirado do NL e rapidamente reaquecido (BENSON, 2008). O estado vítreo pode ser favorecido pelo uso de soluções crioprotetoras ou pelo emprego de técnicas de desidratação (SAKAI et al., 2008).

2.4.1 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que interagem com a membrana plasmática das células exercendo uma ação estabilizadora durante a passagem do estado líquido para um estado sólido amorfo e também durante o reaquecimento, quando o meio retorna para o estado líquido (TAO; LI, 1986). A penetração dessas substâncias nas células contribui para aumentar a quantidade de solutos no citosol, reduzindo assim a temperatura de transição vítrea de uma solução ou material. Ao mesmo tempo precisam apresentar reduzida toxicidade nas concentrações e períodos de exposição requeridos para a sua eficácia (BENSON, 2008).

Os crioprotetores podem ser agrupados em três categorias: penetrantes à parede celular e à membrana plasmática (glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO)); penetrantes à parede celular (aminoácidos como prolina, oligossacarídeos como sacarose e manitol, e polímeros com baixo peso molecular como polietilenoglicol (PEG-1000) e não penetrantes ou extracelulares (macromoléculas de alto peso molecular, como proteínas solúveis, lipídios e polissacarídeos) (TAO e LI, 1986).

Atualmente, existem diversas soluções de vitrificação já bem estabelecidas - os crioprotetores. Os usualmente empregados em soluções de vitrificação são: o glicerol, o DMSO e o etilenoglicol. A sacarose também é muito utilizada durante a fase de pré-cultivo dos explantes, ou seja, antes de submeter o material à imersão em soluções crioprotetoras (SHATNAWI; JOHSON, 2004). Podem ser adicionados também osmoprotetores ao meio de pré-cultivo, sendo uma ferramenta essencial para minimizar a formação de cristais de gelo, que podem ser formados durante o processo de vitrificação (TAO; LI, 1986; MARKOVIĆ et al., 2013). Entretanto, a concentração e o tempo de exposição dos explantes ao meio de pré-cultivo com altas concentrações de sacarose e osmoprotetores, devem ser otimizadas para cada espécie.

A solução de vitrificação mais utilizada em trabalhos de criopreservação é baseada no emprego de crioprotetores penetrantes e não-penetrantes, a *plant vitrification solution* (PVS2), que é composta de 30% de glicerol (p/v), 15% de etilenoglicol (p/v), 15% de DMSO (p/v) e 0,4 M de sacarose, todos diluídos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) basal líquido, e suas variações a PVS1 e a PVS3 (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

2.4.2 Adaptações nas técnicas de criopreservação

Adaptações das técnicas clássicas de vitrificação, baseadas no resfriamento rápido dos explantes, como a *droplet vitrification*, vêm se mostrando com alta aplicabilidade para explantes como ápices caulinares, gemas laterais e embriões somáticos. A técnica consiste no tratamento prévio dos explantes em solução de carregamento (2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose dissolvido em meio MS) e na transferência dos explantes para uma gota de solução crioprotetora, como o PVS2, em uma tira de alumínio e o seu rápido mergulho em NL. O reaquecimento se faz levando a folha de alumínio com os explantes criopreservados para a solução de descarregamento celular (1,2 M de sacarose dissolvida em meio MS) à temperatura ambiente (KARTHA et al., 1982; ENGELMANN, 2004; CHEN et al., 2011).

Protocolos como a *droplet vitrification* que possibilitam a imersão do explante diretamente em NL e um rápido reaquecimento, podem minimizar danos às células, pois evitam a cristalização de água intracelular, aumentando as chances de regeneração dos explantes (MATSUMOTO; SAKAI 2003; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008; SKRLEP et al., 2008; LAMBARDI et al., 2008; CHEN et al., 2011). Porém, o sucesso da utilização da criopreservação para novas espécies ainda depende da otimização e adaptação dos protocolos e das etapas de pré-cultivo/carregamento, crioproteção das células antes da imersão em NL,

reaquecimento, descarregamento celular e regeneração dos explantes (GANINO et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. de A. C. et al. Determinação do teor de umidade limite de sementes de endro (*Anethum graviolens*) para criopreservação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 7, n. 2, p. 153-159, 2007.
- BACHIRI, Y. et al. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 241-248, Dec. 1995.
- BARROS, D. I. et al. Método de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.
- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, p. 15-32, 2008.
- CRUZ, A. C. F. et al. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L.(Bixaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 49, n. 5, p. 1-8, 2013.
- 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, Dec. 2009.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, New York, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, New York, v. 47, n. 4, p. 5-16, 2011.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

FRANCO, C.F. et al. Marcha de absorção dos micronutrientes para mudas de goiabeiras, cultivares Paluma e Século XXI. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 83-90, 2008.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

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, 2010.

GANINO, T. et al. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis rootstock* shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 78-82, Mar. 2012.

GONZALEZ-ARNAO, 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, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, et al. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p. 183-260.

HICKS, G. S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, New York, v. 46, n.1, p. 1-23, Mar. 1980.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 5, n. 6, p. 778, June, 2011.

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

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, 2007.

LÉDO, A. S. et al. Manitol para a conservação *ex situ* de coqueiro por crescimento mínimo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 2, p. 148-151, fev. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 352p.

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.

MANTOVANI, N. C. et al. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vollozo) Arrábida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARKOVIĆ, Z. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. **Central European Journal of Biology**, Warsaw, v. 8, n. 10, p. 993-1000, 2013.

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

MELETTI, L. M. M. **Propagação de frutíferas**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239p.

MOTA, D. M. da; et al. Atores, canais de comercialização e consumo da mangaba no nordeste brasileiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 121-143, 2008.

MOURA, M. D. B.; AGRA, M. F. Apocynaceas tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 3, n. 2, p. 273-279, 1989.

MUKAIDA, T. et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, p. 384-391, 2003.

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

NAIK, B. R. et al. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 3-4, p. 329-338, Apr. 2005.

OLIVEIRA, L.M.Q.; VALIO, I.F.M. Effects of moisture content on germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 69, n. 6, p. 1-5, 1992.

OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 76, p. 443-457, 2013.

PANIS, B. et al. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 161, n. 560, p. 79-86, 2001.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. In: ELECTRONIC FORUM ON BIOTECHNOLOGY IN FOOD AND AGRICULTURE, 13., 2005, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/C13doc.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

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

PAULET, F. et al. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Sacharum* sp.) hybrids using encapsulation dehydration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 6, p. 525-529, 1993.

PEREIRA, J. E. S. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 93-96, mar. 2008.

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

PINHEIRO, C.S.R. et al. Germinação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, p. 85-90, 2001.

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

REZENDE, R. K. S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, 2008.

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

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: 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, 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. 26p.

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.

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

SANTOS, P. A. A. Cultivo e conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. 96p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SARTOR, F. R. et al. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

SERRA, C. P. et al. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, n. 6, 424-432, 2005.

SHATNAWI, M. A.; JOHNSON, A. Cryopreservation by encapsulation-*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 40, n. 2, p. 239-244, 2004.

SILVA JÚNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 1, 2004.

SOARES, F. P. et al. Efeito do meio de 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.

SOARES, F. P. et al. 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, 2011.

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

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 61-64, 1999.

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

TREVIZAM, R. et al. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* ST Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, 2011.

ULISSES, C. et al. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 86-91, 2010.

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

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1 - ORGANOGÊNESE INDIRETA DE MANGABEIRA

RESUMO

Mangabeira é uma frutífera pertencente à família Apocynaceae e possui grande potencial econômico. Vários aspectos de sua propagação necessitam de maiores estudos, uma vez que a porcentagem de germinação das sementes é baixa, devido à presença de inibidores na polpa dos frutos, mas, principalmente, por possuir sementes recalcitrantes. Objetivou-se com este trabalho, obter um protocolo de organogênese indireta e regeneração de brotos. Para a organogênese indireta, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultivo WPM gelificado com ágar 7 g L^{-1} , acrescido de $0,09 \text{ M}$ de sacarose, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de PVP e suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento: 2,4-D ($0,0$; $2,46$; $7,38$; $12,3$ $17,22 \mu\text{M}$), BAP ($0,0$; $4,92$; $9,84$; $14,76$ e $19,68 \mu\text{M}$) e TDZ ($0,0$; $4,92$; $9,84$; $14,76$ e $19,68 \mu\text{M}$). A regeneração das brotações foi realizada em meio de cultivo WPM, acrescido de cinetina em combinação com 2,4-D ($0,0 + 0,0$; $5,0 + 0,0$ e $5,0 + 7,38 \mu\text{M}$). Para o enraizamento, foram utilizadas brotações com aproximadamente, $6,0 \text{ cm}$ de comprimento, mantidas por 15 dias em meio isento de fitorreguladores e em seguida foram submetidas a tratamentos com diferentes auxinas ($9,84 \mu\text{M}$ de AIB; $9,84 \mu\text{M}$ de ANA e $9,84 \mu\text{M}$ de AIA), bem como as combinações entre estes reguladores ($4,92 \mu\text{M}$ AIA + $4,92 \mu\text{M}$ AIB; $4,92 \mu\text{M}$ ANA + $4,92 \mu\text{M}$ AIB; $4,92 \mu\text{M}$ ANA + $4,92 \mu\text{M}$ AIA). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o *software* estatístico SAS®, comparando as médias pelo teste exato de Fischer, com probabilidade de 5%. Houve formação de calos utilizando diferentes concentrações dos reguladores testados. A maior formação de brotações ($72,86\%$) a partir dos calos foi obtida com a concentração de $7,38 \mu\text{M}$ de 2,4-D. Foi obtida maior regeneração de brotos com $7,38 \mu\text{M}$ de 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ de cinetina, com média de $3,7$ brotos por calo. As brotações apresentaram maior porcentagem de enraizamento (80%) e raízes com maior comprimento ($1,3 \text{ cm}$) no tratamento contendo $4,92 \mu\text{M}$ de ANA + $4,92 \mu\text{M}$ de AIB. É possível regenerar e enraizar brotos de mangabeira *in vitro*.

Palavras-chave: Espécie frutífera. Apocynaceae. Reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Mangabeira is a fruit belonging to the Apocynaceae family and has great economic potential. Several aspects of its spread need for further studies, since the percentage of seed germination is low, due to the presence of inhibitors in the pulp, but mainly because it has recalcitrant seeds. The objective of this study was to obtain a protocol for indirect organogenesis and shoot regeneration. For indirect organogenesis, nodal segments were inoculated in culture medium gelled with agar WPM 7 g L⁻¹ plus 0.09 M sucrose, 0,4 g L⁻¹ de PVP and supplemented with different concentrations of growth regulators: 2,4-D (0.0, 2.46, 7.38, 12.3 17.22 µM), BAP (0.0, 4.92, 9.84, 14.76 and 19.68 µM) and TDZ (0.0, 4.92, 9.84, 14.76 and 19.68 µM). Regeneration of shoots was performed in culture medium WPM plus kinetin in combination with 2,4-D (0.0 + 0.0, 5.0 + 0.0 and 5.0 + 7.38 µM). NAA and 9.84 µM; shoots for rooting with approximately 6.0 cm in length, held for 15 days in medium free of growth regulators and then were subjected to treatments with different auxins (9.84 µM were used IBA 9.84 µM AIA), as well as combinations of these regulators (4.92 µM + 4.92 µM IAA IBA, NAA + 4.92 µM 4.92 µM IBA, NAA + 4.92 µM 4.92 µM AIA). Data were subjected to analysis of variance using the SAS ® statistical software, comparing the means by Fisher's exact test, with a probability of 5%. Callus formation was observed using different concentrations of regulators. The highest shoot formation (72.86%) from the callus was obtained with a concentration of 7.38 µM of 2,4-D. Greater shoot regeneration was obtained with 7.38 µM 2,4-D + 5 µM kinetin, with a mean of 3.7 shoots per callus. Shoots showed higher rooting percentage (80%) and roots with greater length (1.3 cm) in the treatment containing 4.92 µM NAA + 4.92 µM IBA. You can regenerate and root sprouts mangabeira in vitro.

Key-words: Fruit species, Apocynaceae, Growth regulators.

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura ocupa lugar de destaque na agricultura mundial, especialmente pela importância social e econômica, gerando empregos e movimentando a economia (SANTOS FILHO et al., 2014). O Brasil se tornou, a partir de 2008, um dos três maiores produtores de frutas do mundo, ficando atrás apenas da China e da Índia, representando 5% da produção mundial. Atualmente, 47% do mercado interno brasileiro são destinados à produção de frutas frescas e, aproximadamente, 3% ao mercado de frutas processadas (FERNANDES, 1998; SANTANA NETA et al., 2013). O crescimento do volume das exportações tem evoluído constantemente devido ao elevado padrão de qualidade da produção nacional, frente às exigências do mercado internacional (BRASIL, 2011).

Devido à baixa produção comercial, as espécies frutíferas nativas do Brasil estão entre as menos comercializadas, em razão dos poucos plantios tecnificados voltados à produção em larga escala. Assim torna-se, alvo de extrativismo pelas comunidades locais com seus frutos, após colhidos, beneficiados por indústrias ou consumidos *in natura* (SOARES et al., 2011). Por outro lado, as espécies nativas se destacam por apresentarem grande adaptabilidade a diferentes regiões e alto valor nutritivo (SILVA JÚNIOR, 2004). Entre as espécies frutíferas nativas com potencial para exploração comercial estão o pequi, umbu, cagaita, araticum, buriti, jatobá e mangabeira (AGOSTINI-COSTA et al., 2006, ÁVILA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) apresenta uma ampla distribuição geográfica, desde o estado do Amapá até o estado de São Paulo (MACHADO et al., 2004). Possui um grande potencial econômico, devido às diversas possibilidades de aproveitamento de seus frutos para produção de xaropes, sucos, doces, sorvetes e compotas (SOARES et al., 2011). O látex exsudado pela planta pode ser empregado na medicina popular para o tratamento de combate à tuberculose (SOUSA et al., 2005) e também contra

inflamações, úlceras e herpes (MOURA; AGRA, 1989; SILVA JÚNIOR, 2004).

Embora a mangabeira apresente elevado potencial econômico, a baixa porcentagem de germinação de suas sementes reduz a produtividade da espécie, influenciando na manutenção e conservação do material vegetal. As principais causas dessa baixa germinação estão relacionadas com a recalitrância das sementes, dificultando seu armazenamento por longos períodos, e com a presença de inibidores, os quais são capazes de realizar fermentação e produzir compostos fenólicos na polpa dos frutos, impedindo a ocorrência da germinação (OLIVEIRA; VALIO, 1992; LORENZI, 2000; BARROS et al., 2006).

O aperfeiçoamento de técnicas de propagação assexuada representa uma importante ferramenta para a seleção de genótipos promissores com aplicação em plantios homogêneos e para a multiplicação em larga escala de mudas (LÉDO et al., 2007). Dentre as técnicas de propagação assexuada destaca-se a micropropagação, a qual é utilizada comercialmente, permitindo que uma planta com características desejáveis possa ser multiplicada em curto espaço de tempo e em condições fitossanitárias adequadas (ULISSES et al., 2010).

Para tanto, a organogênese *in vitro*, visando a maximização da propagação *in vitro*, utiliza células e tecidos vegetais como fonte de explante e leva à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está frequentemente conectado com o tecido de origem, ocorrendo diretamente a partir de células do explante original, ou indiretamente, via formação de calos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O estudo dos processos de indução de organogênese indireta, multiplicação e regeneração de explantes pode levar ao desenvolvimento de protocolos que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos genótipos por transformação genética ou para micropropagação da espécie (PEREIRA et al., 2013).

Assim, o uso de fitorreguladores na micropropagação induz e controla diversas respostas organogênicas. O 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma auxina sintética que pode exercer efeitos semelhantes às auxinas naturais, pois ela é mais estável à degradação, acumulando-se em maiores concentrações do que a auxina natural ácido indolacético (AIA) (PASTERNAK et al., 2002). Para assegurar um crescimento normal, a planta produz quantidades muito controladas de auxinas, as quais se unem as proteínas receptoras específicas e regulam o crescimento vegetal. A proteína ABP1 (*auxin binding protein1*) é caracterizada como uma proteína receptora que tem alta afinidade com auxinas e está associada à indução de raízes adventícias além do alongamento celular (NAPIER et al., 2002). Quando a auxina 2,4-D se encontra em maior quantidade no tecido vegetal, atuará como sinal químico para a ativação gênica, induzindo a transcrição de uma proteína receptora ainda não identificada, chamada de RX, que se liga ao 2,4-D, induzindo e controlando a divisão celular (VASIL, 1982; MERCIER, 2004).

As auxinas também podem atuar na movimentação de nutrientes em direção ao tecido em formação, interferindo no acúmulo de outros compostos necessários para o enraizamento (AMARANTE et al., 2012). Uma das auxinas mais utilizadas na indução do enraizamento é o ácido indolbutírico (AIB), o qual não é tóxico para a maioria das plantas e é relativamente estável (RADMANN et al., 2002; PIRES; WENDLING; BRONDANI, 2013). O AIA, por ser uma auxina instável, degrada-se facilmente pela ação da luz, sendo menos absorvida, em comparação às demais auxinas sintéticas (CALDAS et al., 1990; AMARANTE et al., 2012).

Após o estabelecimento das plantas micropropagadas, o processo de aclimatização é necessário para a adaptação de plantas cultivadas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (BOSA et al., 2003). Este processo tem sido uma das fases mais críticas na micropropagação, pois existem vários fatores abióticos que interferem no processo de aclimatização, sendo os principais:

luminosidade, disponibilidade de nutrientes e a umidade relativa do ar (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013).

Outro fator que interfere no processo de aclimatização é a absorção de água e íons pelo sistema radicular. Na aclimatização, a planta é retirada das condições assépticas, onde contava somente com os compostos orgânicos acumulados nas partes aérea e radicular, não necessitando de realizar fotossíntese. Após passar para o ambiente externo, é necessário absorver água e sais minerais do substrato e, para completar o processo de fotossíntese, as raízes produzidas *in vitro* ajudam em princípio nessa absorção. Logo, as plantas obtidas *in vitro* adquirem raízes funcionais e pelos absorventes (HAZARICA, 2003; FERMINO JÚNIOR et al., 2013), culminando com o sucesso no processo de aclimatização.

Objetivou-se com este trabalho, estabelecer uma metodologia de micropropagação via organogênese indireta para mangabeira, visando à produção de mudas micropropagadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Foram utilizados como fonte de explantes, brotações de mangabeira previamente multiplicadas *in vitro* em meio de cultivo *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 8,87 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar conforme Soares et al. (2011).

2.1 Organogênese indireta a partir de segmentos nodais

Explantes nodais de plantas obtidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultivo WPM gelificado com ágar 7 g L^{-1} , acrescido de 0,09 M de sacarose, 0,4 g L^{-1} de PVP (Polivinilpirrolidona), suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento: 2,4-D: 0,0; 2,46; 7,38; 12,3 e 17,22 μM ; BAP: 0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM e Thidiazuron (TDZ): 0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM . Os explantes foram incubados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro. Foi avaliada, após 30 dias de cultivo, a porcentagem de formação de brotações.

2.2 Regeneração *in vitro* das brotações

Os brotos com 60 dias de cultivo *in vitro*, oriundos da organogênese indireta, foram individualizados e inoculados em meio de cultivo WPM, acrescido de 0,09 M de sacarose, 0,4 g L^{-1} de PVP e gelificado com ágar 7 g L^{-1} suplementado com cinetina em combinação com 2,4-D (0,0 + 0,0; 5,0 + 0,0 e 5,0 + 7,38 μM). Os explantes foram incubados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de

fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo foram: número de brotações e comprimento médio das brotações (cm).

2.3 Enraizamento *in vitro* de brotações

Após a multiplicação *in vitro*, as brotações foram transferidas para meio de cultivo WPM com ausência de fitorreguladores e cultivadas por 15 dias. Decorrido este período, as brotações, com cerca de 6 cm de comprimento, foram transferidas para o meio de cultivo WPM acrescido com 0,09 M de sacarose e suplementado com $9,84 \mu\text{M}$ de AIB, $9,84 \mu\text{M}$ de ácido naftaleno acético (ANA) e $9,84 \mu\text{M}$ de AIA e combinações destes reguladores $4,92 \mu\text{M}$ AIA + $4,92 \mu\text{M}$ AIB; $4,92 \mu\text{M}$ ANA + $4,92 \mu\text{M}$ AIB e $4,92 \mu\text{M}$ ANA + $4,92 \mu\text{M}$ AIA. Os explantes foram incubados durante 30 dias em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As variáveis avaliadas foram porcentagem de enraizamento (%), número de raízes e comprimento médio das raízes (cm).

As plantas obtidas por meio de organogênese indireta, com 60 dias de cultivo, passaram por um período de sete dias de pré-aclimatização, em tubetes com volume de 250 mL, contendo Plantmax[®], envoltos com saco plástico transparente para manutenção da umidade relativa no ambiente, em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Após esse período, foi feita a abertura do recipiente de cultivo e as plantas permaneceram mais 15 dias em sala de aclimatização. Os tubetes com as plantas foram levados para casa de vegetação, onde permaneceram por mais 15 dias, antes do transplante para vasos contendo Plantmax[®]. Após 30 dias em casa de vegetação, foi realizada a avaliação da porcentagem (%) de sobrevivência das plantas.

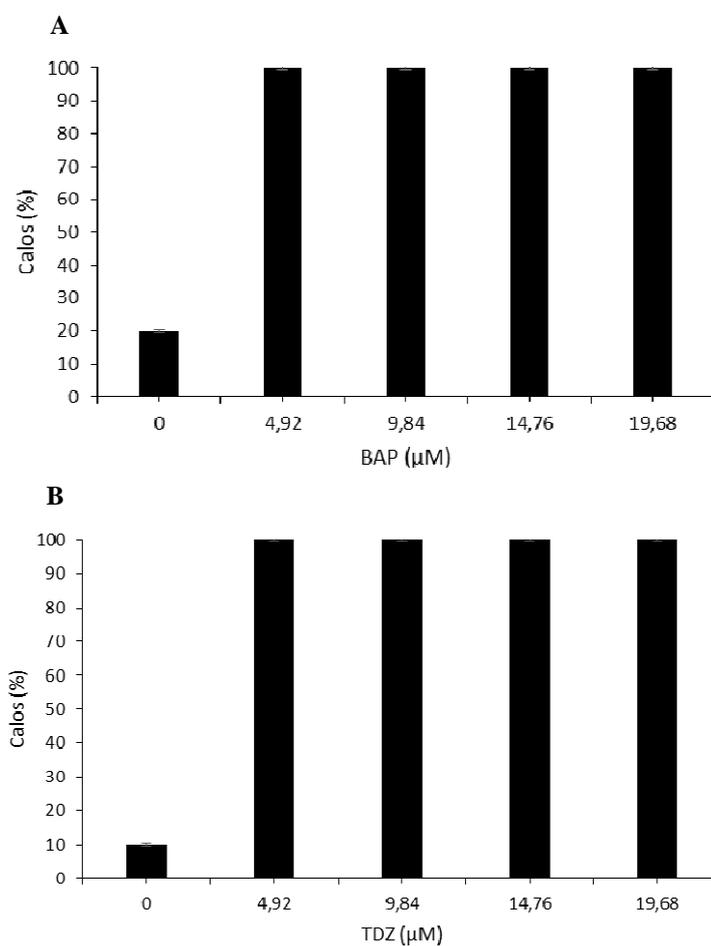
2.4 Análises Estatísticas

Foram utilizadas 30 repetições por tratamento e os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o *software* estatístico SAS®, comparando as frequências pelo teste exato de Fischer, probabilidade de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Organogênese indireta a partir de segmentos nodais

Houve diferença significativa na porcentagem de formação de calos em explantes nodais inoculados em meio de cultivo com ou sem a presença de reguladores de crescimento (Figura 1A, 1B e 1C).



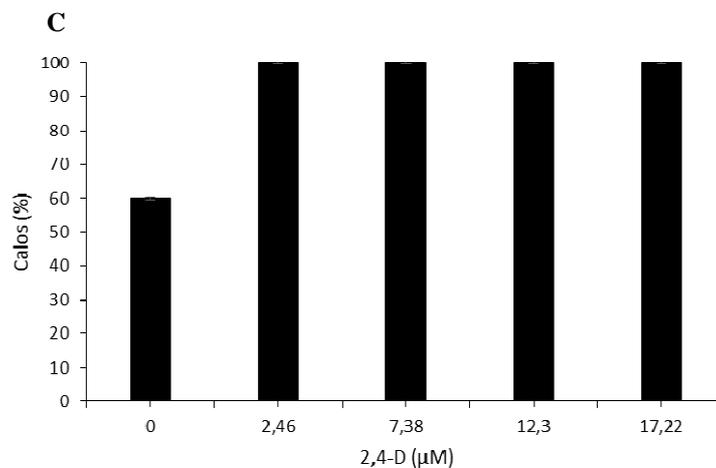


FIGURA 1 Porcentagem de calos obtidos a partir de explantes nodais de mangabeira submetidos a diferentes concentrações de BAP (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 µM) (A), TDZ (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 µM) (B) e 2,4-D (0,0; 2,46; 7,31, 12,2 e 17,22 µM) (C), aos 30 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste exato de Fisher, a 5% de probabilidade.

Os diferentes reguladores de crescimento e suas concentrações influenciaram na desdiferenciação dos segmentos nodais em calos. Na Figura 2A, está ilustrado o segmento nodal em meio de cultivo sem a presença de reguladores, sendo observado somente o intumescimento do explante após 30 dias de cultivo *in vitro*. Os calos oriundos do cultivo em presença dos reguladores BAP e 2,4-D, com 30 dias após a inoculação, apresentaram aspecto friável, de fácil desagregação e com coloração inicial branca (Figura 2B e 2D). Já os calos obtidos após utilização de TDZ no meio de cultivo apresentaram coloração inicial marrom escura, com posterior oxidação dos explantes (Figura 2C).

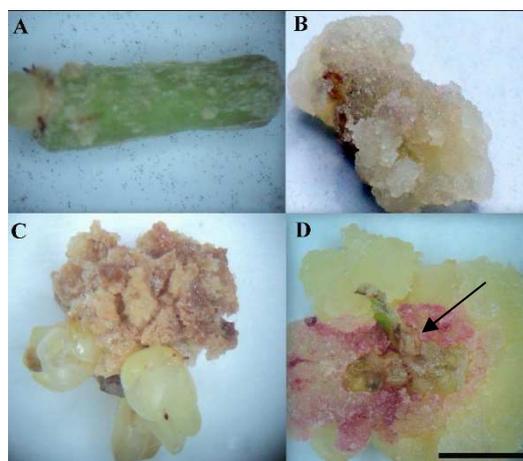


FIGURA 2 Aspecto visual de calos formados em explantes nodais de mangabeira em meio de cultivo WPM sem a presença de reguladores de crescimento (A). Em meio de cultivo WPM suplementado com 9,84 μM de BAP (B), 9,84 μM de TDZ (C) e 7,38 μM de 2,4-D, evidenciando a formação de brotações (seta) (D), aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 0,5 cm.

Entretanto, a posterior diferenciação de calos em brotações foi obtida com as concentrações de 9,84 e 14,76 μM de BAP e TDZ, respectivamente (Figura 1A e 1B) e em todas as concentrações testadas de 2,4-D (0,0; 2,46; 7,38; 12,3 e 17,22 μM). Sendo a maior porcentagem de formação de brotações (72,9%) obtida na concentração de 7,38 μM de 2,4-D (Figura 1C). Não havendo formação de brotações nos tratamentos sem a presença de fitorreguladores.

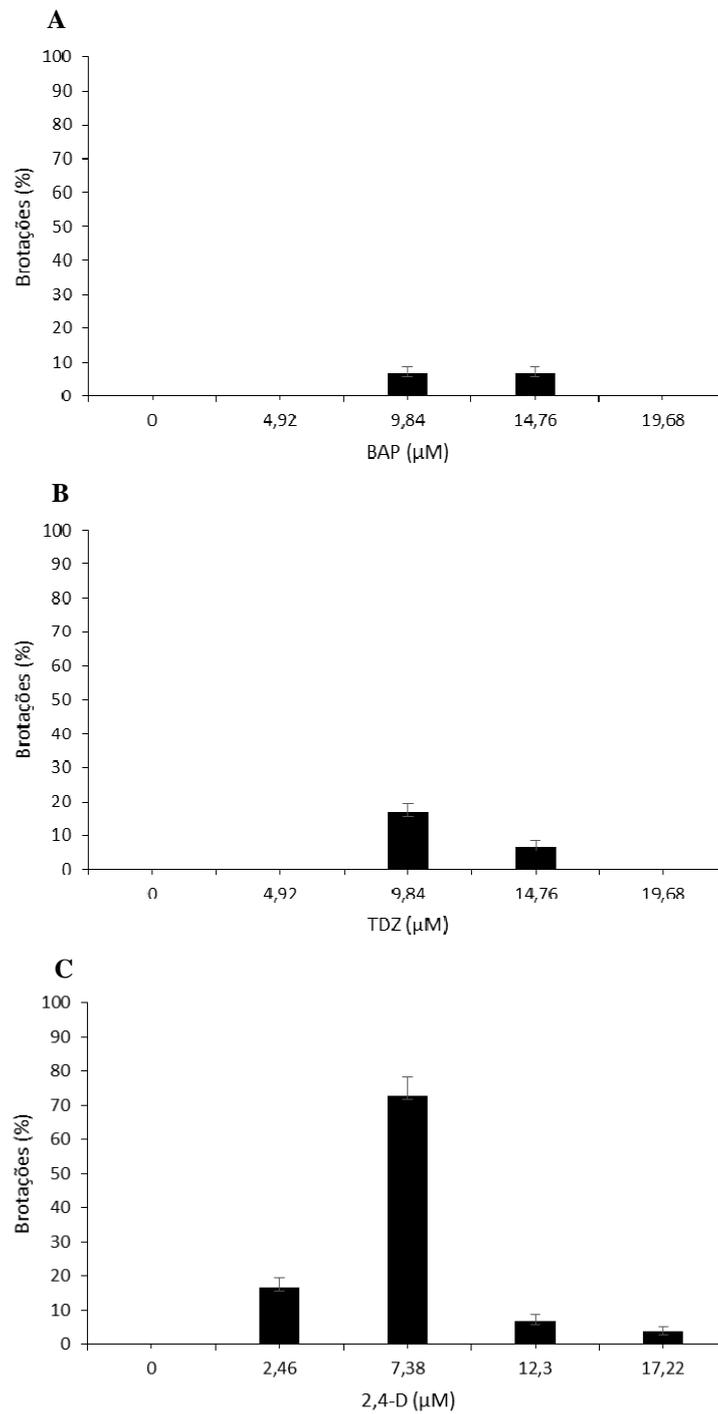


FIGURA 1 Porcentagem de brotações obtidas por organogênese indireta a partir de explantes nodais de mangabeira submetidos a diferentes concentrações de BAP (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM) (A), TDZ (0,0; 4,92; 9,84; 14,76 e 19,68 μM) (B) e 2,4-D

(0,0; 2,46; 7,31, 12,2 e 17,22 μM) (C), aos 30 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste exato de Fisher, a 5% de probabilidade.

A auxina 2,4-D no meio de cultivo induziu uma resposta favorável na obtenção de organogênese indireta em explantes nodais de mangabeira, sendo a competência dos tecidos organogênicos aparentemente adquirida durante o período inicial do cultivo na presença de altos níveis de auxinas (MERCIER, 2004).

Resultados semelhantes foram obtidos com explantes foliares e pecíolos de *Melothria maderaspatana* (Linn.), onde foi verificado maior porcentagem de calos (98,2%) em meio de cultivo suplementado com 6 μM de 2,4-D combinado com 0,5 μM de TDZ, com posterior formação de brotos (BASKARAN et al., 2009). A superioridade do 2,4-D em relação a outras fontes de auxina e citocininas, na organogênese indireta, foi registrada por Bona et al. (2012) em experimentos visando à indução de calos em *Lavandula angustifolia*, utilizando apenas 1 mg L^{-1} de 2,4-D, combinado com 0,5 mg L^{-1} de GA_3 . E também em segmentos foliares de aroeira-do-sertão utilizando 2,4-D, com maior taxa de calogênese e posterior formação de brotações obtida na concentração de 4,52 μM desse regulador vegetal (VASCONCELOS et al., 2012).

3.2 Regeneração *in vitro* das brotações

Houve aumento significativo no número de brotações no meio de cultivo WPM suplementado com 5 μM de cinetina combinado com 7,38 μM de 2,4-D, com média de 3,7 brotos por calo (Figura 3A). Houve aumento também no comprimento médio dos brotos formados, com média de 9,2 cm (Figura 3B).

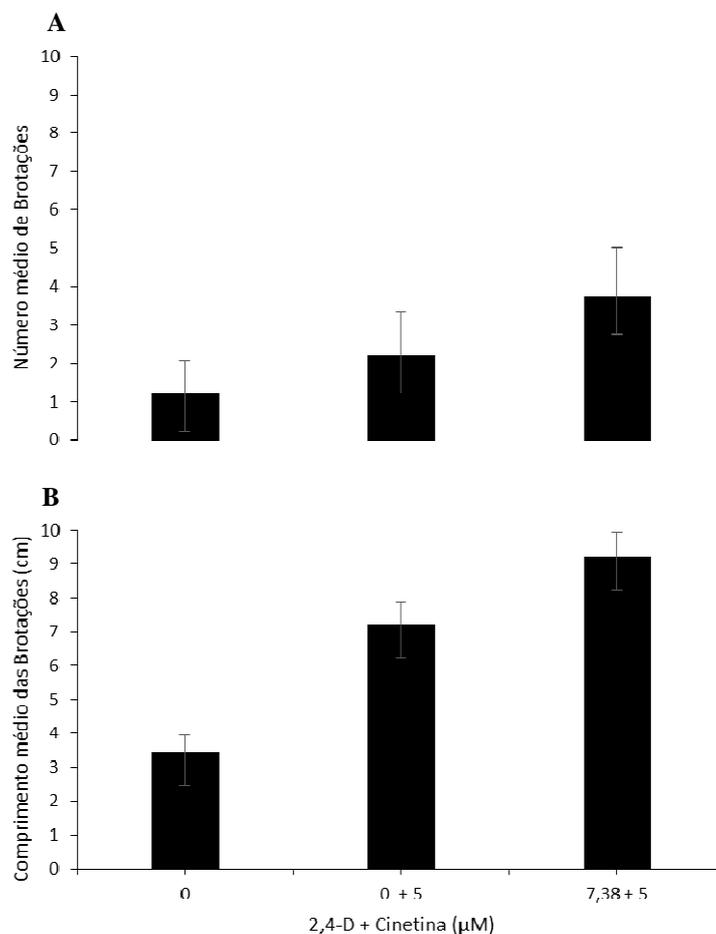


FIGURA 3 Número de brotações obtidas por organogênese indireta em meio de cultivo WPM ou suplementado com 5 μM de cinetina combinado com ausência ou 7,38 μM de 2,4-D (A) e comprimento médio das brotações oriundas do cultivo em meio WPM basal ou suplementado com 5 μM de cinetina combinado com ausência ou 7,38 μM de 2,4-D (B). As barras representam o erro padrão da média, de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

A combinação de auxinas e citocininas no meio de cultivo, após a formação de brotações, é necessária para um rápido crescimento celular com organização radicular e da parte aérea (CAMPBELL, 1997; LUCAS et al., 2013). Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Soleimani et al. (2013) verificaram efeito positivo sobre a formação de novos brotos em

explantes foliares de *Catharanthus roseus*, com a combinação de auxinas e citocininas no meio de cultivo *in vitro*. Resultado observado também por Jefery et al., 2013 estudando Pervinca (*Catharanthus roseus*), no meio suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 0,5 mg L⁻¹ de cinetina, sendo essa combinação eficaz na organogênese indireta e, principalmente, na multiplicação de brotações.

O aspecto visual das brotações formadas em explantes nodais de mangabeira inoculados em meio de cultivo WPM suplementado com 5 µM de cinetina combinado com 7,38 µM de 2,4-D, demonstra que a combinação entre auxinas e citocininas pode influenciar de forma significativa o crescimento de brotações em mangabeira (Figura 4).

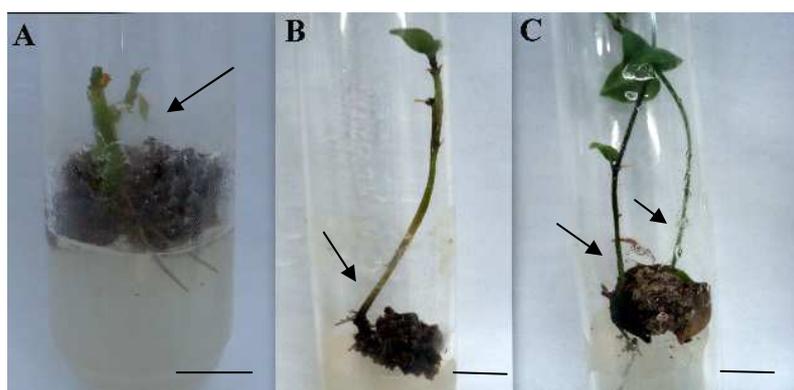
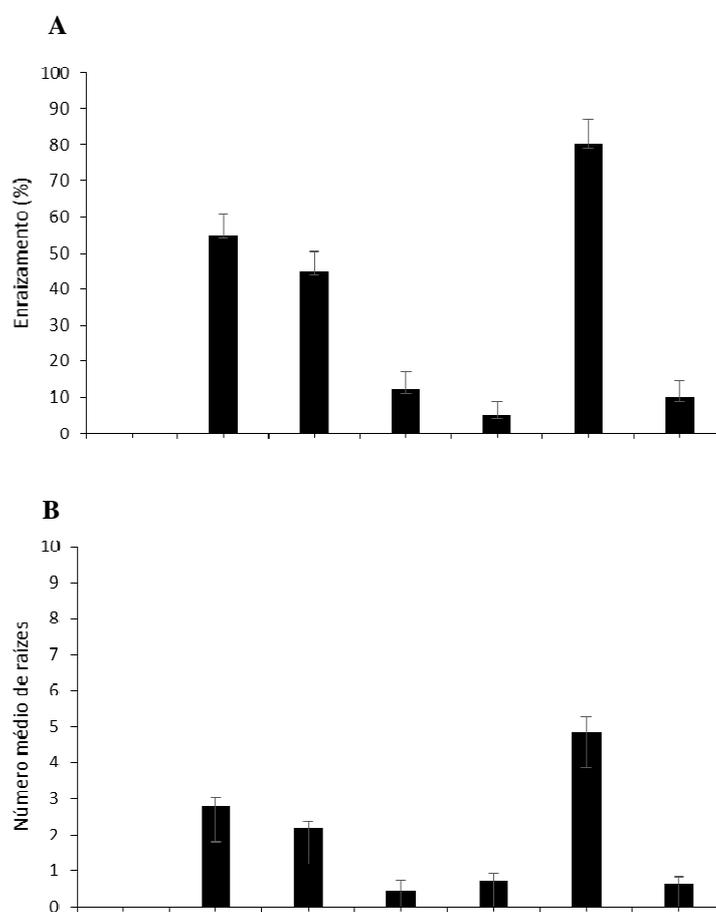


FIGURA 4 Aspecto visual das brotações de mangabeira oriundas do meio de cultivo WPM suplementado com 7,38 µM de 2,4-D, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, evidenciando a formação de brotações (seta) barra = 1cm (A) e aos 45 dias de cultivo *in vitro*, evidenciando a brotação formada (seta) barra = 0,5cm (B). E brotações de mangabeira após transferência para o meio de cultivo WPM suplementado com a combinação de 5 µM de cinetina combinado com 7,38 µM de 2,4-D, aos 15 dias de cultivo *in vitro*, evidenciando as brotações (seta) barra = 0,5cm (C).

3.3 Enraizamento *in vitro* de brotações

As brotações apresentaram maior porcentagem de enraizamento (80%), maior número (4,83) e maior comprimento de raízes (0,43 cm) com a combinação dos reguladores ANA e AIB (4,92 μ M ANA + 4,92 μ M AIB) (Figura 5).



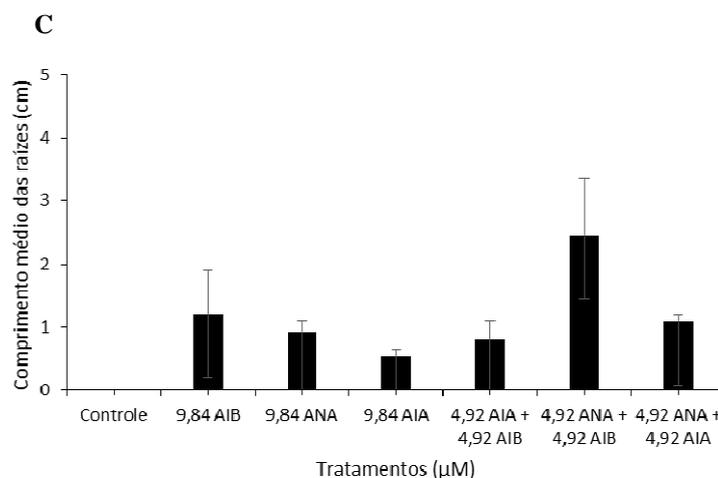


FIGURA 5 Porcentagem de enraizamento *in vitro* de mangabeira (A), número médio de raízes obtidas a partir do enraizamento *in vitro* de mangabeira (B) e comprimento médio das raízes obtidas a partir do enraizamento *in vitro* de mangabeira, utilizando diferentes concentrações de auxinas (9,84 µM de AIB; 9,84 µM de ANA e 9,84 µM de AIA), bem como as combinações entre estes reguladores (4,92 µM AIA + 4,92 µM AIB; 4,92 µM ANA + 4,92 µM AIB; 4,92 µM ANA + 4,92 µM AIA). Aos 30 dias de cultivo *in vitro*. As barras representam o erro padrão da média de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

O processo de enraizamento adventício envolve a conjugação entre auxinas internas e externas e quando a espécie possui uma concentração adequada do hormônio endógeno AIA, a conjugação com reguladores vegetais sintéticos como o AIB ou ANA, por determinados períodos, é suficiente para induzir a formação de raiz sob condições *in vitro* (SOUZA et al., 2011).

Neste estudo, a combinação de auxinas foi eficiente na indução do enraizamento *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados para outras espécies lenhosas, como angico (KIELSE et al., 2009) e cerejeira (FERMINO JUNIOR; PEREIRA, 2012).

O enraizamento das brotações obtidas a partir de organogênese indireta apresentou variações morfológicas entre os diferentes tratamentos. Os tratamentos com auxinas isoladas apresentaram raízes mais delgadas e dificuldade para o crescimento em profundidade (Figura 6A e 6B). Já a combinação de auxinas ANA e AIB influenciou no número e comprimento das raízes, sendo observado engrossamento no sistema radicular e melhor crescimento em profundidade, não sendo influenciada pela presença de calos (Figura 6C).

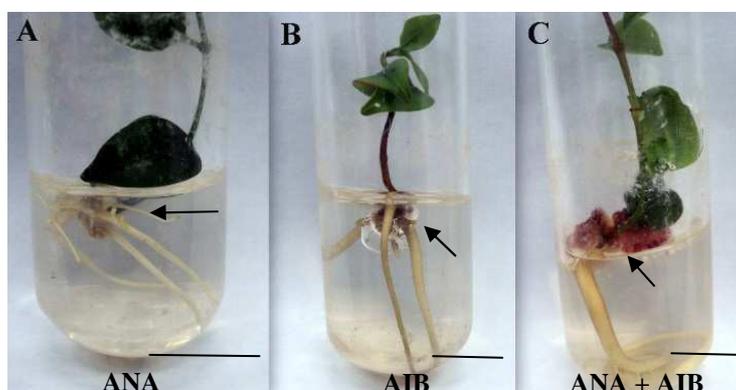


FIGURA 6 Aspecto visual de raízes cultivadas *in vitro* em meio de cultivo WPM suplementado com $9,84 \mu\text{M}$ de ANA, evidenciando o sistema radicular (seta) barra = 1cm (A) meio de cultivo WPM suplementado com $9,84 \mu\text{M}$ de AIB, evidenciando o sistema radicular a partir de calos (seta) barra = 1cm (B) e em meio de cultivo WPM suplementado com $4,92 \mu\text{M}$ de ANA combinado com $4,92 \mu\text{M}$ de AIB, evidenciando o sistema radicular a partir de calos (seta) barra = 1cm (C) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

A variação no número e no comprimento de raízes observada, neste estudo, indica que os fatores de enraizamento e crescimento, como, por exemplo, concentração de hormônios e açúcares, também atuam e agem de forma diferenciada nas diversas espécies, em especial às lenhosas (VIGNOLO et al., 2014). O comprimento das raízes pode ter relação com a concentração endógena mais elevada de auxinas, ou à combinação destas ser

favorável ao maior desenvolvimento do sistema radicular (ANTUNES et al., 2000).

De modo geral, espécies lenhosas apresentam maior dificuldade para o enraizamento adventício, sendo essa etapa ainda mais difícil quando a brotação advém de organogênese indireta, pois a formação de calos na base das brotações pode prejudicar a diferenciação de raízes (MANTOVANI et al., 2010; DE OLIVEIRA; DIAS; BONDANI, 2013). Entretanto, o calo pode conter células isoladas ou em grupo que possuem centros ativos de divisão celular, onde induzidas em condições adequadas se capacitam para produção de novos órgãos (JARDIM et al., 2010), o que pode explicar a eficiência do processo de enraizamento a partir de calos.

A formação de raízes adventícias nas brotações obtidas no estágio de multiplicação para a obtenção de plantas completas se torna necessária ao processo de aclimatização (LENCIANI et al., 2014). As plantas de mangabeira, oriundas da organogênese indireta e enraizadas *in vitro*, foram aclimatizadas com sucesso, apresentando 100% de sobrevivência (Figura 7).



FIGURA 7 Aspecto visual de plantas de mangabeira aclimatizadas utilizando substrato Plantmax[®] em casa de vegetação. Barra = 1 cm

CONCLUSÃO

O meio de cultivo WPM suplementado com 7,38 μM de 2,4-D proporciona maior formação de brotos em explantes nodais de mangabeira, via organogênese indireta.

O meio de cultivo WPM, suplementado com 5 μM de cinetina combinado com 7,38 μM de 2,4-D, foi eficaz na regeneração de brotações de mangabeira.

O enraizamento *in vitro* da mangabeira pode ser obtido em meio de cultivo WPM suplementado com a combinação de ANA (4,92 μM) e AIB (4,92 μM).

As plantas de mangabeira, oriundas da organogênese indireta e enraizadas *in vitro*, foram aclimatizadas com sucesso, apresentando 100% de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.S. et al. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R.F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.
- AMARANTE, L. et al. Influências do ácido naftaleno acético e escuro e atividade da peroxidase no enraizamento *in vitro* de aspargo (*Asparagus officinalis* L.). **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 7, n. 1, 2012.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Blossom and ripening periods of blackberry varieties in Brazil. **Journal of the American Pomological Society**, University Park, v. 54, n. 4, p. 164- 168, 2000.
- ÁVILA, R. et al. Caracterização dos frutos nativos dos cerrados: araticum, baru e jatobá. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 1, n. 1, p. 53-69, 2010.
- BARROS, D. I. et al. Método de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.
- BASKARAN, P. et al. *In vitro* regeneration of *Melothria maderaspatana* via indirect organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 45, n. 4, p. 407-413, 2009.
- BONA, C. M. et al. Curva de crescimento de calos e formação de suspensões celulares de Lavandula. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, Recife, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2012.
- BOSA, N. et al. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 514-519, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produção integrada no Brasil**. Brasília: Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, 2011. 1008p.

CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p.37-70.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2012.

FERNANDES, M. S. **A cadeia produtiva da fruticultura**. CNPq. Agronegócio brasileiro; ciência, tecnologia e competitividade. Brasília: CNPq, 1998. p. 201-214.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. G. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, mar./abr. 2013.

GONÇALVES, L. G. V. et al. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, Recife, v. 36, n. 1, p. 31-40, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p. 183-260.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, New York, v. 85, n. 12, p.1704-1712, 2003.

JARDIM, L. S. et al. Effect of different growth regulators *in vitro* propagation of *Aniba rosaeodora* Ducke. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 275-279, jun. 2010.

KIELSE, P. et al. *In vitro* regeneration of *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009.

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, 2007.

LENCINAI, K. H. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, 2014.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantanarum, 2000. 352p.

LUCAS, M. A. K. et al. Micropropagação de violeta-africana: estabelecimento e iniciação de culturas com a utilização de benzilaminopurina e ácido indolacético. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 14, n. 3, 2013.

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.

MANTOVANI, N. C. et al. Resgate vegetativo por alporquia de genótipos adultos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 403-410, 2010.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 217-249.

MOUBAYIDIN, L. et al. The rate of cell differentiation controls the arabidopsis root meristem growth phase. **Current Biology**, Londres, v. 20, n. 12, p.1138-1143, 2010.

MOURA, M. D. B.; AGRA, M. F. Apocynaceas tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 3, n. 2, p. 273-279, 1989.

NAPIER, R. M. et al. A short history of auxin-binding proteins. In: Auxin Molecular Biology. **Plant molecular Biology**, Netherlands, v. 49, p. 339-348, 2002.

OLIVEIRA, L.M.Q.; VALIO, I.F.M. Effects of moisture contention germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 69, n. 6, p. 1-5, 1992.

OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PASTERNAK, T. P. et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplastderived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.1807– 1819, 2002.

PEREIRA, R. P. W. et al. Callogenesis in stem explants of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) showing resilience in oxide calluses. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 407-416, 2013.

PIRES, P. P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Indol-butyric acid and orthotropism in minicutting of *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 37, n. 3, p. 393-399, 2013.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

SANTANA NETA, L. G. et al. Tecnologias patenteadas para produção de frutas tropicais desidratadas. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 5, p. 348-361, 2013.

SANTOS FILHO, E. M. et al. Caracterização da distribuição e algumas perdas de pós-colheita do maracujá amarelo produzido no município de Cuité-pb. **Agropecuária científica no semiárido**, Campina Grande, v. 10, n. 1, 2014.

SILVA JÚNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 1, 2004.

SOARES, F. P. et al. 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

SOLEIMANI, F. et al. Effects of 2,4-D and kinetin concentrations on vinblastine and vincristine alkaloid contents in callus of periwinkle (*Catharanthus roseus*). **International Journal of AgriScience**, v. 3, n. 10, p. 759-765, 2013.

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

SOUZA, A. V. de et al. Micropropagation of *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

ULISSES, C. et al. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 86-91, 2010.

VASCONCELOS, J. N. C. et al. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-7, 2012.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 101-103.

VIGNOLO, G. K. et al. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 467-472, 2014.

**ARTIGO 2 - CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS E DE
UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE MANGABEIRA**

RESUMO

A mangabeira é uma espécie frutífera que possui potencial econômico. Porém, a baixa porcentagem de germinação e a recalcitrância de suas sementes reduz a produtividade da espécie, influenciando na manutenção e conservação do material vegetal. Objetivou-se com este trabalho estudar a criopreservação de mangabeira utilizando as técnicas de *droplet vitrification* e encapsulamento-vitrificação para gemas laterais de mangabeira. Gemas laterais foram inoculadas em meio de cultivo WPM com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM), GA_3 (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) e 0,25 μM de BAP combinado com GA_3 (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM). As gemas foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM acrescido com 0,3 M de sacarose combinado com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1, 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas) na ausência de luz. Após o pré-cultivo, as gemas foram imersas em PVS2 a 0 °C por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) e posteriormente, submetidas à técnica *droplet vitrification*. O encapsulamento de gemas laterais foi obtido em matriz de alginato, na presença ou ausência de BAP (0,0 ou 0,2 μM). As cápsulas foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM líquido, acrescido com diferentes concentrações de sacarose (0,3, 0,75 e 1 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas). Para o encapsulamento-desidratação, as cápsulas foram submetidas à desidratação em sílica gel ou fluxo laminar por 0, 1, 2 e 3 horas antes da imersão em PVS2 a 0 °C por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). A maior porcentagem de número de brotos (72,86%) a partir dos calos foi obtida na concentração de 7,38 μM de 2,4-D. Foi obtida maior regeneração de brotos com a combinação de 5 μM de cinetina + 7,38 μM de 2,4-D, com média de 3,7 brotos por calo. As brotações apresentaram maior porcentagem de enraizamento (80%) e raízes com maior comprimento (1,3 cm) no tratamento com 4,92 μM de ANA + 4,92 μM de AIB. O meio acrescido de 0,2 μM de BAP proporcionou as maiores taxas de regeneração de gemas laterais. O pré-cultivo em 0,3 M de sacarose + 0,1 M de prolina por 24 horas promoveu um aumento na porcentagem de sobrevivência (83,33%) e maior formação de brotações (93,33%) na criopreservação. A utilização da PVS2 por 15 minutos antes da aplicação da técnica *droplet vitrification* promoveu maiores taxas de sobrevivência (78%). Foram observadas elevadas taxas de sobrevivência também para gemas laterais encapsuladas na presença de 0,2 μM de BAP (86%). O melhor meio de pré-cultivo foi o meio de cultivo WPM líquido acrescido de 0,75 M de sacarose combinado com 1,0 M de glicerol por 24 horas, associado com a desidratação em câmara de fluxo por 1 hora. A criopreservação de gemas laterais encapsuladas foi obtida com sucesso com o uso de PVS2, com alta taxa de sobrevivência (69%) e elevada formação de brotos (87%).

Palavras-chave: *Hancornia sp.* Conservação em longo prazo. Vitrificação.

ABSTRACT

Mangabeira is a fruit species that have economic potential. However, the low percentage of germination and the recalcitrance of its seeds reduces the productivity of the species, influencing the maintenance and conservation of plant material. The objective of this work was to study cryopreservation mangabeira using the techniques of droplet vitrification and encapsulation-vitrification for side mangabeira gems. Lateral buds were inoculated in WPM culture medium with different concentrations of BAP (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM), GA3 (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM) and 0.25 μM BAP combined with GA3 (0.0, 0.2, 0.8 and 1.6 μM). Buds were pre-cultured in culture medium WPM supplemented with 0.3 M sucrose combined with different concentrations of proline (0.0, 0.1, 0.2 and 0.3 M) for different times (24 and 48 hours) in the absence of light. After the pre-cultivation the shoots were immersed in PVS2 at 0 °C for different times (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) and subsequently subjected to droplet vitrification technique. The encapsulation of lateral buds were obtained in the alginate matrix, the presence or absence of BAP (0.0 or 0.2 μM). The capsules were pre-grown in liquid WPM culture medium, supplemented with different concentrations of sucrose (0.3, 0.75 and 1 M) for different times (24 and 48 hours). For the dehydration-encapsulation, the capsules were subjected to silica gel dehydration or laminar flow with 0, 1, 2 and 3 hours before immersion in PVS2 at 0 °C for different times (0, 15, 30, 60 and 120 minutes). The highest percentage of number of shoots (72.86%) from the callus was obtained at a concentration of 7.38 μM of 2,4-D. Greater shoot regeneration with a combination of 5 μM kinetin + 7.38 μM of 2,4-D, with a mean of 3.7 shoots per callus was obtained. Shoots showed higher rooting percentage (80%) and roots with greater length (1.3 cm) in treatment with 4.92 μM NAA + 4.92 μM IBA. The plus 0.2 μM BAP medium led to the highest rates of regeneration of lateral buds. The preculture in 0.3 M sucrose + 0.1 M proline for 24 hours promoted an increase in survival percentage (83.33%) and increased shoot formation (93.33%) in cryopreservation. The use of PVS2 for 15 minutes before applying the droplet vitrification technique showed higher survival rates (78%). Too high survival rates were observed for lateral buds encapsulated in the presence of 0.2 μM of BAP (86%). The best way to the preculture was WPM culture medium plus 0.75 M sucrose combined with 1.0 M glycerol for 24 hours, dehydration associated with the flow chamber for 1 hour liquid. Cryopreservation of lateral buds encapsulated was successfully obtained using PVS2 with high survival rate (69%) and high shoot formation (87%).

Key-words: *Hancornia sp.*, Long-term conservation; Vitrification.

1 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera da família Apocynaceae, é uma espécie nativa do Brasil e pode ser encontrada em várias regiões do país, desde o Amapá até o estado de São Paulo (SILVA JUNIOR et al., 2007). Seus frutos possuem aroma e sabor agradáveis, e são utilizados na produção de xaropes, sucos, doces, sorvetes e compotas (SOARES et al., 2011). É uma fruta rica em ferro e fonte de vitamina C, o que lhe garante uma posição de destaque entre os alimentos funcionais (SILVA JÚNIOR, 2004). Entretanto, a espécie é alvo de extrativismo predatório, diminuindo sua ocorrência natural em áreas nativas e a quantidade do alimento para consumo.

Outro fator que interfere na disponibilidade de frutos da espécie é a baixa porcentagem de germinação das sementes, devido à produção de compostos fenólicos na polpa que retardam os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, agindo como antagonistas de promotores do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (MEDEIROS, 2001), além da recalcitrância de suas sementes, inviabilizando o armazenamento convencional (OLIVEIRA; VALIO, 1992; LORENZI, 2000; BARROS et al., 2006).

Diversos explantes podem ser utilizados na regeneração de plantas *in vitro*, e na seleção dos explantes, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido a ser utilizado e a finalidade da micropropagação (BASSAN et al., 2006). Explantes oriundos de regiões meristemáticas apresentam vantagens em comparação a outros tipos de explantes na micropropagação. Pois, órgãos ou tecidos jovens, como embriões imaturos, possuem o obstáculo de estarem disponíveis apenas em um curto período de tempo. Já explantes oriundos da região basal e meristemática podem ser obtidos em qualquer época, sem a dependência do ciclo da planta, tendo ainda como vantagem o tamanho reduzido, podendo

ser encapsulados ou submetidos a técnicas de criopreservação (REY et al., 2013).

A conservação de germoplasma de espécies vegetais vem sendo muito utilizada, evitando-se assim o risco de extinção e permitindo que vários genótipos estejam disponíveis para utilização futura (FLORES et al., 2013). A conservação pode ser agrupada em duas categorias: Conservação *in situ*, realizada no local de origem, ou *ex-situ*, fora do seu local de origem. Na conservação *ex situ* podem ser mantidos sementes, brotações, plantas inteiras ou outras estruturas vegetais em diferentes condições, tais como no campo ou em casa de vegetação, em câmara seca sob baixa temperatura ou em meio de cultivo com baixa concentração salina, e também estruturas reprodutivas, como embriões e meristemas criopreservados em nitrogênio líquido (NL) (WETZEL et al., 2007; LOPES et al., 2013).

Nas condições de criopreservação, também conhecidas como conservação em longo prazo, ocorre a garantia da viabilidade do material biológico sem que esse sofra modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (ENGELMANN, 2011). A manutenção do material por longos períodos acontece mediante técnicas que armazenam material biológico vivo em NL a ultrabaixas temperaturas (-196 °C), diminuindo ou até mesmo paralisando o metabolismo celular. Essa técnica de armazenamento tem se mostrado prática e eficiente, devido ao pequeno volume de material armazenado, simplificação nos procedimentos de intercâmbio de material e a baixa exigência de manutenção, principalmente da necessidade de repetidos subcultivos com frequente contaminação dos explantes (MELETTI et al., 2007; REED, 2008; KACZMARCZYK et al., 2011).

Durante o processo de criopreservação, cuidados nas etapas iniciais são essenciais para garantir o sucesso da técnica. A adição de crioprotetores no meio de pré-cultivo e a definição do tempo de exposição do explante às soluções crioprotetoras, chamado tempo de equilíbrio, devem ser testados previamente para cada espécie e tipo de explante, garantindo assim a

penetração do crioprotetor e posterior proteção celular. Juntamente com a escolha do melhor meio de regeneração dos explantes após passarem pelo NL (CASTRO et al., 2011). A prolina, um aminoácido que se acumula naturalmente nas células e órgãos de plantas em resposta a estresses abióticos, como limitação de água, modificação do potencial redox, congelamento, etc., pode ser adicionada em alguns protocolos de criopreservação, nas soluções crioprotetoras ou utilizada na fase de pré-cultivo dos explantes, com o intuito de maximizar a sobrevivência dos explantes criopreservados (BURRITT, 2012). Além disso, a prolina apresenta também efeito antioxidante, ajudando a combater espécies reativas de oxigênio (EROs) que, geralmente, surgem após a desidratação celular (MARKOVIĆ et al., 2013).

Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre algumas delas é dependente da espécie e do explante a ser criopreservado (PANIS; LAMBARDI, 2005). Uma das técnicas de criopreservação desenvolvida recentemente é a *droplet vitrification*, que consiste no pré-tratamento dos explantes com solução de vitrificação antes que eles sejam dispostos em tiras de papel alumínio com uma gota de PVS2 e então imersos em NL (ENGELMANN, 2011). Este procedimento permite taxas de resfriamento ultrarrápidas, diminuindo a formação de cristais de gelo, prejudiciais à célula (FULLER et al., 2004). A *droplet vitrification* é utilizada com sucesso para muitas espécies, como: *Limonium serotinum* (BARRACO et al., 2011), *Byrsonima intermedia* (SILVA et al., 2013), cana-de-açúcar (NOGUEIRA et al., 2013) e *Rosa canina* e *Rosa rubiginosa* (PAWŁOWSKA; SZEWCZYK-TARANIEK, 2014). E é considerada uma forma viável de complementar os esforços para conservação da biodiversidade (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Outra técnica muito empregada com o intuito de conservar as espécies em baixas temperaturas é o encapsulamento-vitrificação, desenvolvida com base na produção de sementes sintéticas (ENGELMANN et al., 2008; SUBRAMANIAM et al., 2013). As cápsulas a base de alginato,

semelhantes às feitas na técnica de semente sintética, protegem os explantes sensíveis contra as condições prejudiciais para explantes não-encapsulados (SUBRAMANIAM et al., 2013). Desse modo, as técnicas de criopreservação quando aplicadas de forma correta, se tornam uma ferramenta promissora para o sucesso da criação de bancos de germoplasma, em que o material vegetal criopreservado estará prontamente disponível para ser regenerado (RAVEN; HAVENS, 2014).

Objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação pelas técnicas *droplet vitrification* e encapsulamento-vitrificação para gemas laterais de mangabeira, visando encontrar um método de conservação em longo prazo eficiente para esta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Foram utilizados como fonte de explantes, brotações de mangabeira previamente multiplicadas *in vitro* em meio de cultivo *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 8,87 μM de 6 benzilaminopurina (BAP), 0,09 M de sacarose e gelificado com 7 g L^{-1} de ágar conforme Soares et al. (2011).

2.1 Regeneração de gemas laterais

Para a regeneração de brotações, gemas laterais com aproximadamente 1 mm^2 foram excisadas e inoculadas em placas de Petri com meio de cultivo WPM, acrescido com 0,09 M de sacarose, 0,4 g L^{-1} de PVP (Polivinilpirrolidona), gelificado com 7 g L^{-1} ágar, e suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) e ácido giberélico (GA_3) (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM). O tratamento suplementado com GA_3 foi combinado com ausência ou 0,25 μM de BAP. Os explantes foram mantidos na ausência de luz por uma semana e após esse período as placas foram transferidas para um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A variável avaliada após 30 dias de cultivo *in vitro* foi a porcentagem de regeneração das gemas laterais.

2.2 Pré-cultivo de gemas laterais

Gemas laterais com aproximadamente 1 mm^2 foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM acrescido com 0,3 M de sacarose combinada com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas) na ausência de luz. Posteriormente foram inoculadas

em meio de cultivo WPM, suplementado com 0,2 μM de BAP, 0,09 M de sacarose, 0,4 g L^{-1} de PVP, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. As variáveis avaliadas, após 30 dias de cultivo, foram: porcentagem de sobrevivência e porcentagem de formação de brotações.

2.3 Droplet vitrification

Gemas laterais (1 mm^2) foram pré-cultivas em meio de cultivo WPM acrescido com 0,3 M de sacarose combinada com 0,1 M de prolina por 24 horas na ausência de luz. Em seguida, foram tratadas com solução de carregamento (0,4 M de sacarose + 2 M de glicerol) por 20 minutos antes da imersão em PVS2 (*Plant Vitrification Solution*) (3,26 M de glicerol + 2,42 M de etilenoglicol + 1,9 M de dimetilsufóxido (DMSO) + 0,4 M de sacarose), a 0 °C, por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). Após o tratamento em PVS2, os explantes foram dispostos em tiras de papel de alumínio (0,5 x 2,0 cm), contendo uma gota de PVS2, antes da imersão em NL, onde permaneceram por 30 minutos. Após esse período, foram reaquecidos por 15 minutos em uma solução de descarregamento composta de 0,4 M de sacarose à 25 °C. Todas as soluções foram dissolvidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram filtro-esterilizadas.

Após o reaquecimento, as gemas laterais foram inoculadas em meio de regeneração de gemas. Os explantes foram mantidos no escuro por uma semana e, em seguida, transferidos para um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. As variáveis avaliadas, após 30 dias de cultivo, foram: porcentagem de sobrevivência e porcentagem de formação de brotos.

2.4 Encapsulamento de gemas laterais

Gemas laterais (1 mm^2) foram imersas em meio de cultivo WPM, acrescido com $0,09 \text{ M}$ de sacarose, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de PVP e alginato 2,5% (SIGMA[®]). Em seguida, os explantes foram resgatados individualmente e gotejados em solução de cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 20 minutos, caracterizando a fase de complexação. As cápsulas foram imersas em água destilada autoclavada por três vezes para retirada do excesso de cloreto de cálcio. Posteriormente, foram imersas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação por 15 minutos antes da inoculação em meio de regeneração de gemas. As unidades encapsuláveis foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. As variáveis avaliadas, após 30 dias de cultivo, foram: porcentagem de regeneração de gemas encapsuladas, comprimento de brotações (cm) e número de folhas por brotação.

2.5 Encapsulamento-desidratação

Após o encapsulamento, foi testado o meio de pré-cultivo. Cápsulas contendo as gemas laterais foram incubadas em meio WPM líquido, acrescido com diferentes concentrações de sacarose ($0,3$; $0,75$ e $1,0 \text{ M}$) e suplementado com 1 M de glicerol por diferentes tempos (24 e 48 horas) sob constante agitação à 150 rpm . Após o período de pré-cultivo, as cápsulas foram imersas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para a descomplexação por 15 minutos. Em seguida, foram inoculadas em meio de regeneração de gemas e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das gemas encapsuladas.

Determinado qual o tempo de pré-cultivo e qual a concentração de sacarose, as cápsulas foram submetidas a dois procedimentos diferentes de desidratação: em câmara de fluxo laminar e em sílica gel. Em ambos os procedimentos, as cápsulas foram depositadas em caixas tipo Gerbox, as quais foram abertas no fluxo laminar com duas folhas de papel germitest ou fechadas com 80 g de sílica gel, por diferentes períodos (0, 1, 2 e 3 horas). Após a desidratação, as cápsulas foram descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos e posteriormente foram inoculadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de BAP, 0,09 M de sacarose, 3,6 μM de PVP, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar. As cápsulas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A variável avaliada, após 30 dias de cultivo, foi a porcentagem de regeneração das gemas encapsuladas.

2.6 Encapsulamento-vitrificação

Gemas laterais encapsuladas foram pré-cultivadas em meio de cultivo WPM líquido acrescido de 0,75 M de sacarose sob constante agitação à 150 rpm por 24 horas, com posterior desidratação em câmara de fluxo laminar por 1 hora. As cápsulas foram então tratadas com solução de carregamento por 20 minutos antes da imersão em PVS2, a 0 °C, por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). Após o tratamento em PVS2, as cápsulas foram inseridas em criotubos de 2 mL e imersas em NL onde permaneceram por 30 minutos. O reaquecimento foi realizado em banho-maria à temperatura de 40 °C por três minutos e, em seguida, as cápsulas foram imersas em solução de descarregamento a 25 °C por 15 minutos. Após a criopreservação, as cápsulas foram descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos e inoculadas em meio pós-cultivo, composto por meio de cultivo WPM suplementado com 0,3 M de sacarose por 24 horas na ausência de luz. Posteriormente as

cápsulas foram inoculadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de BAP, 0,09 M de sacarose, 0,4 g L^{-1} de PVP e gelificado com 7 g L^{-1} de ágar. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. As variáveis avaliadas, após 30 dias de cultivo, foram: porcentagem de sobrevivência e porcentagem de formação de brotações.

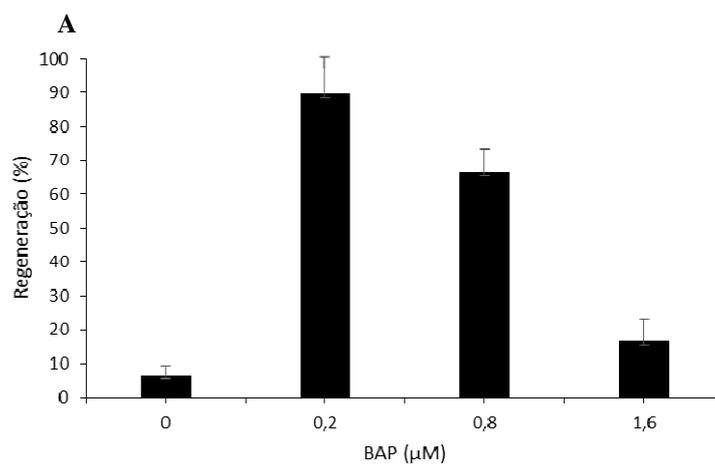
2.7 Estatística

Foram utilizadas 30 repetições por tratamento. Os dados não paramétricos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o *software* estatístico SAS[®], comparando as frequências pelo teste exato de Fischer com probabilidade de 5%. Já os dados paramétricos, foram submetidos à análise de variância utilizando-se o *software* estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011), comparando as frequências pelo teste de Skott-knott com probabilidade de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Regeneração de gemas laterais

As gemas laterais inoculadas em meio de cultivo WPM acrescido com 0,2 μM de BAP apresentaram as maiores porcentagens de regeneração (89,7%) (Figura 1A). Já as gemas laterais inoculadas em meio de cultivo WPM acrescido de GA_3 isoladamente ou em combinação com BAP apresentaram as menores porcentagens de regeneração, com posterior oxidação dos explantes (Figura 1B e 1C).



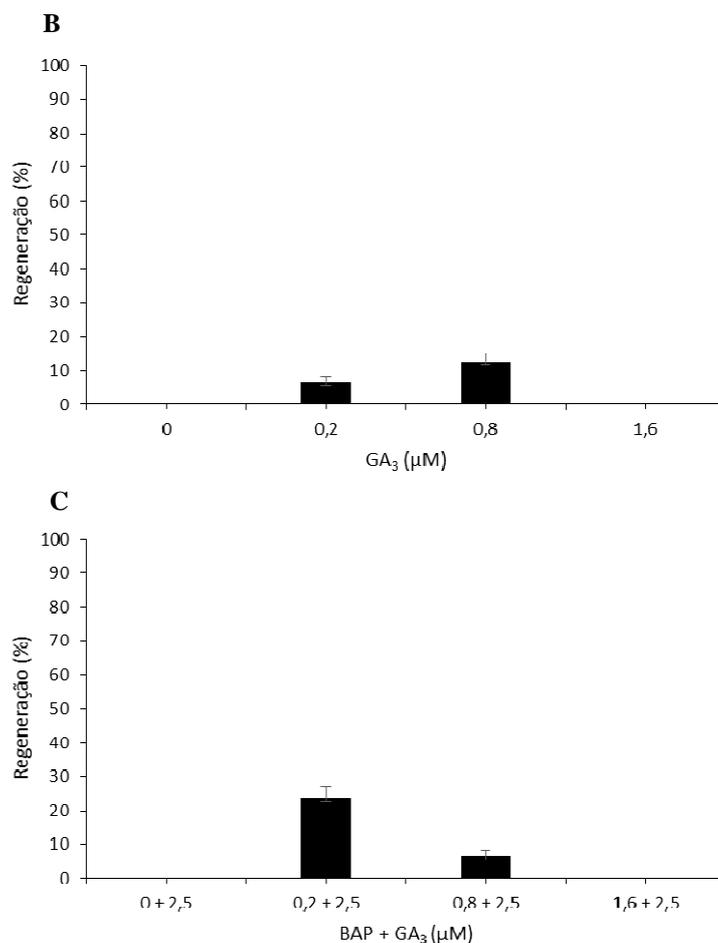


FIGURA 1 Porcentagem de regeneração de gemas laterais de mangabeira em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) (A), GA₃ (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) (B) e GA₃ (0,0; 0,2; 0,8 e 1,6 μM) combinado com 0,25 μM de BAP (C), aos 30 dias de cultivo *in vitro*. As barras nos gráficos representam o erro padrão da média, de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

As gemas laterais inoculadas em meio de cultivo suplementado com 0,2 μM de BAP regeneraram 30 dias após a inoculação e as brotações advindas desse tratamento apresentaram, visualmente, maior vigor, folhas mais verdes e maior padrão de uniformidade (Figura 2A, 2B, 2C e 2D).

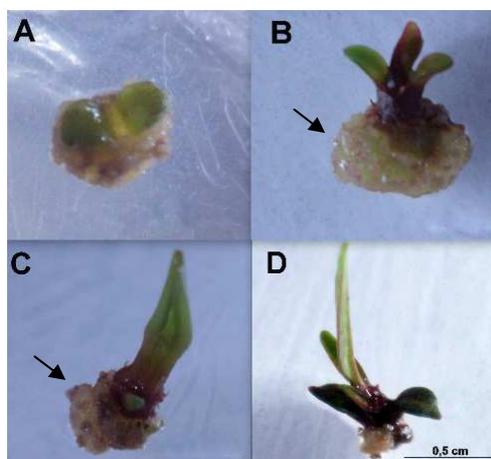


FIGURA 2 Aspecto visual de gemas laterais cultivadas em meio de cultivo WPM suplementado com $0,2 \mu\text{M}$ de BAP, aos 7 dias de cultivo *in vitro* (A), 15 dias de cultivo *in vitro*, evidenciando calos na base do explante (seta) (B), 22 dias de cultivo *in vitro*, evidenciando calos na base do explante (seta) (C) e aos 30 dias de cultivo *in vitro* (D). Barra= 0,5 cm.

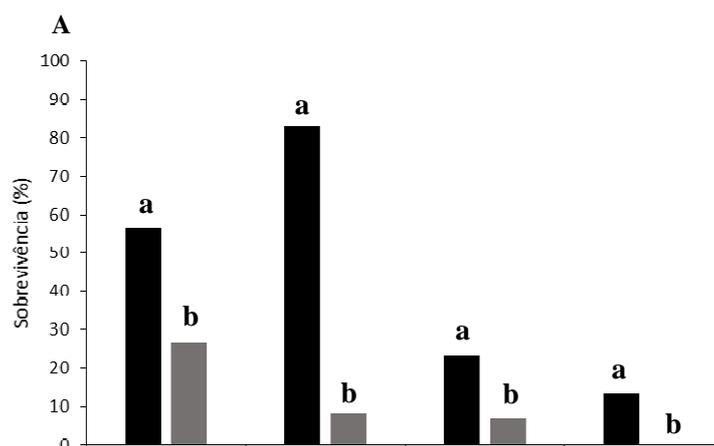
Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, no qual a utilização de BAP usado isoladamente no meio de cultivo obteve efeitos benéficos na regeneração de gemas laterais de mangabeira, alguns trabalhos também demonstram o efeito positivo da utilização da BAP promovendo altas taxas de regeneração de diferentes espécies. Entrenós de macieira, inoculados em meio de cultivo suplementado $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, obtiveram as maiores taxas de regeneração (SCHUCH et al., 2012). Para a regeneração e crescimento de brotos de abacaxi, 2 mg L^{-1} de BAP no meio MS promoveu as melhores respostas *in vitro* (ADEL; ROSNA, 2011).

Embora as citocininas sejam um dos reguladores de crescimento mais utilizados na micropropagação, outros reguladores podem ter participação importante em diversas etapas do processo. Neste estudo, o GA_3 foi utilizado conjuntamente com BAP, visando aumentar a porcentagem de regeneração de gemas laterais, mas não foram obtidos resultados positivos com esta combinação, resultando em inibição do crescimento das gemas. Em contrapartida, Dias et al., (2009), trabalhando com o abacaxizeiro do cerrado

(*A. comosus* var. *ananassoides*), observaram que em explantes nodais a interação entre 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou maior número de brotações, superando os tratamentos em que não foi utilizado o ácido giberélico.

3.2 Pré-cultivo de gemas laterais

O pré-cultivo de gemas laterais em meio de cultivo WPM contendo 0,1 M de prolina por 24 horas, aumentou significativamente a porcentagem de sobrevivência dos explantes (83,33%) (Figura 3A) e a porcentagem de regeneração de brotações (93,33%) (Figura 3B).



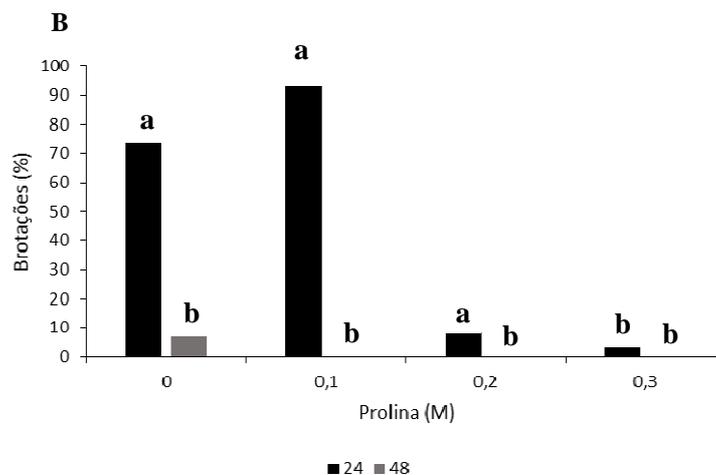


FIGURA 3 Porcentagem de sobrevivência de gemas laterais de mangabeira pré-cultivadas em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas) (A) e porcentagem de regeneração de brotações de mangabeira pré-cultivados em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de prolina não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

O meio de pré-cultivo é acrescido de alta concentração de sacarose (0,3 M), o que ajuda a promover a redução do conteúdo de água dos explantes por desidratação (efeito osmótico) reduzindo assim o ponto de congelamento da água presente nos tecidos e tem sido apontada como uma das causas das altas taxas de sobrevivência dos explantes após imersão em NL (PANIS et al., 1996; CARPENTIER et al., 2010).

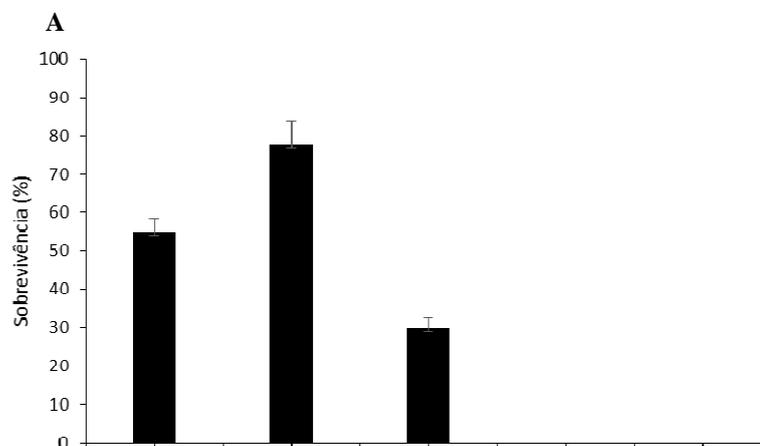
Para obtenção de resultados satisfatórios após o processo de criopreservação, a crioproteção e máxima estabilização das membranas celulares devem ser induzidas através da aplicação de crioprotetores (CAROLSFELD, 2003). A adição de solutos orgânicos, como a prolina ao meio de pré-cultivo, pode atuar também desempenhando esse papel, protegendo membranas celulares e enzimas contra danos irreversíveis causados pelo processo de criopreservação (UBERTI, 2012).

Os resultados satisfatórios obtidos nesse estudo em meio contendo 0,1 M de prolina foram semelhantes aos observados em gemas laterais de videira (*Vitis vinifera* L. cv Portan) cultivadas em meio de pré-cultivo MS acrescido de 50 μ M de prolina, também foi avaliada maior taxa de sobrevivência (MARKOVIĆ et al., 2013).

3.3 Droplet vitrification

A criopreservação de gemas laterais foi obtida com sucesso quando se utilizou a PVS2 por 15 minutos antes da imersão em NL, com 78% de sobrevivência (Figura 4A) e 84% de formação de brotações (Figura 4B).

Enquanto que as gemas tratadas por 30 minutos em PVS2 apresentaram uma redução na sobrevivência, sem posterior formação de brotações, o que pode ser explicado pela toxicidade da PVS2 em gemas laterais após 15 minutos de exposição.



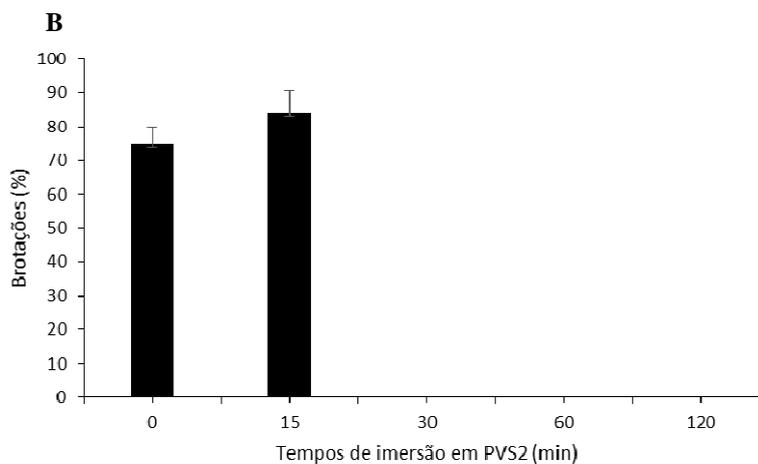


FIGURA 4 Porcentagem de sobrevivência de gemas laterais expostas à solução crioprotetora PVS2 por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) antes da imersão em NL (A). E porcentagem de formação de brotos em gemas laterais expostas à solução crioprotetora PVS2 por diferentes períodos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) antes da imersão em NL (B). As barras nos gráficos representam o erro padrão da média de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

As gemas laterais, submetidas a 15 minutos de PVS2 e posterior imersão em NL, apresentaram formação de parte aérea aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 5).

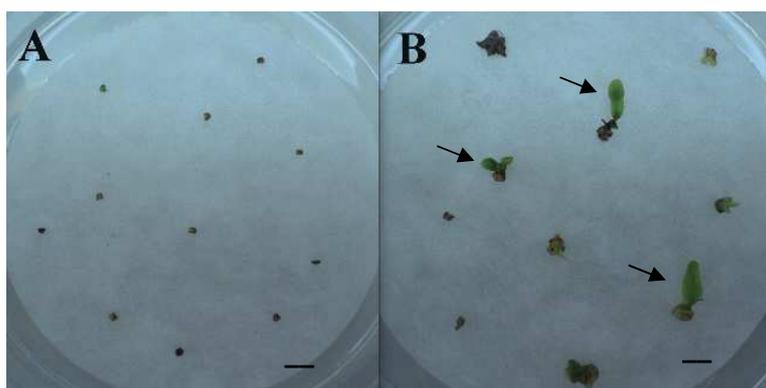


FIGURA 5 Aspecto visual de gemas laterais de mangabeira em meio de cultivo WPM, após 15 minutos de exposição à solução crioprotetora PVS2 e imersão em NL pela técnica *droplet vitrification*. Aos 2 dias após o cultivo em meio de regeneração

in vitro (A) e aos 30 dias após o cultivo em meio de regeneração *in vitro* (B). Barra = 1 cm.

A imersão dos explantes na solução crioprotetora PVS2 por 15 minutos promoveu a desidratação e osmoproteção ideal às células expostas ao NL, prevenindo-as de 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).

Resultados semelhantes foram observados por Silva et al., 2013, com *Byrsonima intermedia*, espécie medicinal do cerrado, em que a imersão durante 15 minutos à solução crioprotetora PVS2, antes da utilização da técnica *droplet vitrification* para ápices caulinares, proporcionou a maior taxa de sobrevivência (100%). Em gemas laterais de videira (*Vitis vinifera* L. cv Portan), a imersão dos explantes em solução crioprotetora PVS2 por 15 minutos, também propiciou maior taxa de sobrevivência (MARKOVIĆ et al., 2013).

3.4 Encapsulamento de gemas laterais

Elevadas taxas de sobrevivência de gemas laterais foram observadas em meio de cultivo WPM suplementado com 0,2 µM de BAP (86%) (Figura 6A), comprimento médio das brotações de 7,4 cm (Figura 6B) e número médio de folhas de 8,5 (Figura 6C). A regeneração ao longo do tempo das gemas laterais encapsuladas está ilustrada na Figura 7.

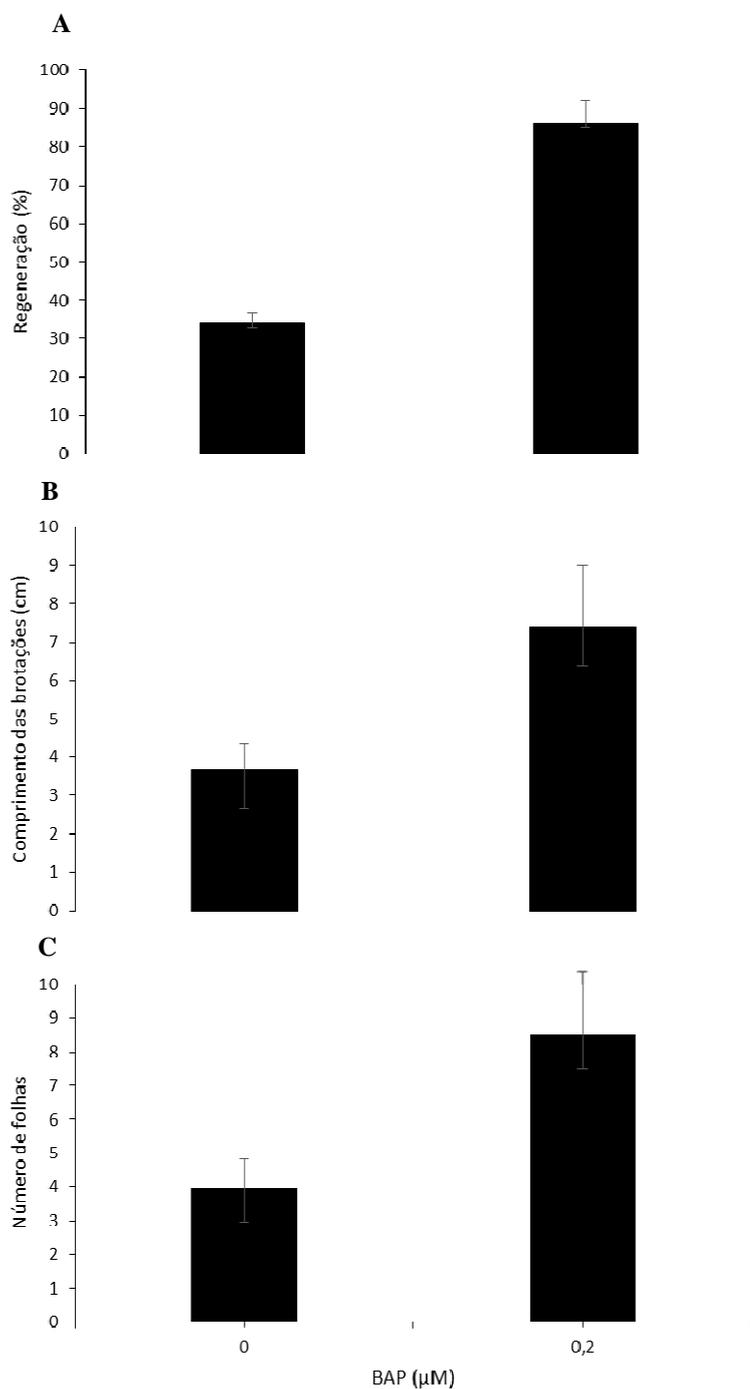


FIGURA 6 Porcentagem de regeneração de gemas laterais (A), comprimento médio (cm) das brotações (B) e número médio de folhas nas brotações obtidas de gemas laterais encapsuladas em matriz de alginato suplementada com a presença ou ausência de BAP (0,2 μM) (C) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. As barras nos gráficos

representam o erro padrão da média, de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

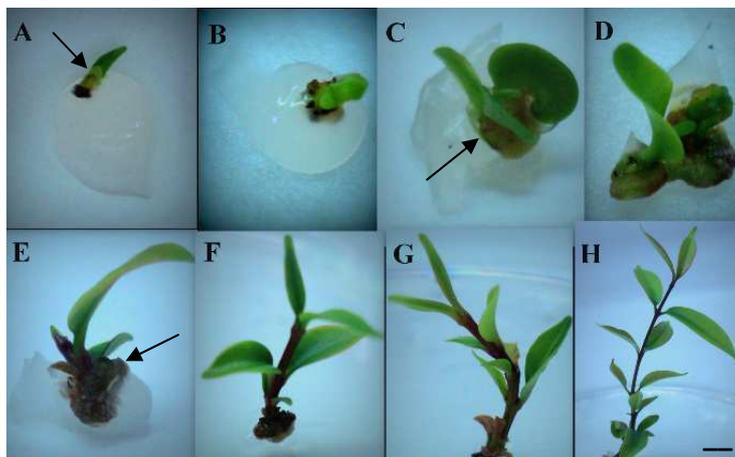


FIGURA 7 Aspecto visual da regeneração de gemas laterais encapsuladas em matriz de alginato suplementada com $0,2 \mu\text{M}$ de BAP. Aos 7 dias após o cultivo *in vitro*, evidenciando o rompimento da cápsula e crescimento inicial das gemas (seta) (A), aos 15 dias após o cultivo *in vitro* (B), aos 30 dias após o cultivo *in vitro* evidenciando a formação de parte aérea (seta) (C), aos 37 dias após o cultivo *in vitro* (D), aos 45 dias após o cultivo *in vitro*, evidenciando o desenvolvimento nodal (seta) (E), aos 52 dias após o cultivo *in vitro* (F), aos 60 dias após o cultivo *in vitro*, evidenciando a formação de brotações (seta) (G) e aos 75 dias após o cultivo *in vitro* (H). Barra = 0,5 cm

Os resultados positivos na regeneração de gemas laterais encapsuladas servem de base para protocolos de conservação *in vitro* que envolvam o uso de unidades encapsuláveis, como o encapsulamento-desidratação e o encapsulamento-vitrificação (RAI et al., 2009).

Em estudos anteriores com mangabeira, foram observadas em segmentos caulinares encapsulados elevadas taxas de regeneração em meio de cultivo WPM contendo metade da concentração de sais e suplementado com $8,87 \mu\text{M}$ BAP (NOGUEIRA, 2010). Resultados semelhantes foram registrados por Santos (2013) utilizando ápices caulinares de mangabeira encapsulados, apresentando elevadas taxas de regeneração (74%), porém não

foram observadas diferenças significativas nas diferentes constituições de cápsulas e meio de cultivo.

A utilização do encapsulamento tem sido eficiente para outros tipos de explantes e outras espécies, como em embriões somáticos encapsulados de *Swertia chirayita*, com adição de BAP na matriz de alginato, com taxa de 84% de regeneração (KUMAR; CHANDRA, 2014), evidenciando os aspectos promissores da técnica em cultura de tecidos.

3.5 Encapsulamento-desidratação

Após o pré-cultivo das cápsulas em meio WPM líquido com diferentes concentrações de sacarose por diferentes períodos de tempo, a maior porcentagem de regeneração foi obtida no tratamento com 0,75 M de sacarose após 24 horas de pré-cultivo (Figura 8). As gemas laterais romperam a cápsula e apresentaram formação de parte aérea (Figura 9).

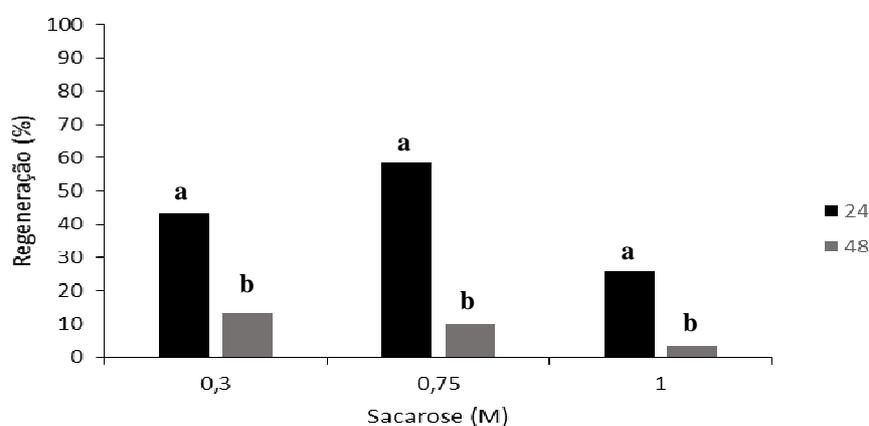


FIGURA 8 Porcentagem de regeneração de gemas laterais encapsuladas em matriz de alginato, submetidas a tratamentos de pré-cultivo em meio de cultivo WPM líquido suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,3; 0,75 e 1,0 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de prolina não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

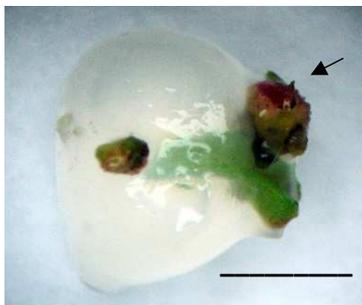


FIGURA 9 Aspecto visual da gema lateral de mangabeira encapsula e pré-cultivada em meio WPM líquido suplementado com 0,75 M de sacarose combinado com 1,0 M de glicerol por 24 horas. Evidenciando o rompimento da cápsula (seta) 10 dias após o cultivo *in vitro*. Barra = 1cm.

A desidratação das cápsulas apresentou diferença significativa entre os tratamentos em sílica gel ou em câmara de fluxo laminar com maior porcentagem de sobrevivência (78%) em explantes expostos a desidratação em câmara de fluxo laminar por 1 hora, cujas cápsulas apresentaram 34% de teor de água (Tabela 1).

TABELA 1 Porcentagem de teor de água e regeneração de unidades encapsuláveis de mangabeira, submetidas à secagem em sílica gel ou em câmara de fluxo laminar por diferentes tempos.

Tempo (h)	Teor de água (%)		Regeneração (%)	
	Fluxo	Sílica	Fluxo	Sílica
Controle	99,7	99,4	85,0aA	82,0aA
1	34,0	33,9	78,0bA	69,0bB
2	23,5	9,5	16,5cA	0,0cB
3	11,8	8,4	0,0dA	0,0cA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de significância.

Entre as técnicas de pré-tratamento já descritas para a criopreservação de tecidos vegetais, o encapsulamento-desidratação apresenta diversas vantagens, como fácil manuseio dos explantes e armazenamento de grande quantidade de tecidos frágeis (MELO, 2008). Portanto, protocolos de desidratação são necessários para realizar a diminuição do conteúdo de água do material vegetal, sendo possível o congelamento dos tecidos com menores riscos de injúrias causadas durante o processo de criopreservação, através da expansão da água ao congelar-se e a formação de cristais de gelo extra e intracelular (VERTUCCI e FARRANT, 1995).

Assim, a desidratação atua amenizando ao máximo essas etapas críticas e é um dos pontos cruciais para o sucesso da criopreservação, sendo o teor de água ideal a este processo de aproximadamente 20-30% do conteúdo de água total (VERTUCCI e FARRANT, 1995; SILVA et al., 2014). Entretanto, quando a água é removida das células, os solutos tornam-se mais concentrados, possivelmente aumentando a taxa de reações químicas destrutivas. Alguns solutos podem cristalizar-se, mudando o potencial iônico e o pH da solução intracelular, alterando assim o status metabólico da célula (KRAMER e BOYER, 1995; ROCKWELL et al., 2014).

O teor de água das cápsulas (34%), que obteve as maiores taxas de regeneração, está entre os níveis adequados de hidratação das cápsulas para posterior criopreservação. Resultados semelhantes foram observados em ápices caulinares de *Rabdosia rubescens* encapsulados e pré-cultivados em alta concentração de sacarose (0,4 M) combinada com 2 M de glicerol e desidratados por 1 hora em sílica gel, atingindo 21% de conteúdo de água, sendo a taxa de regeneração das cápsulas de 85% (AI; LU; SONG, 2012).

Sendo assim, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de água que seja baixo, o suficiente, para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação (ROCKWELL et al., 2014).

3.6 Encapsulamento-vitrificação

A criopreservação de gemas laterais encapsuladas foi obtida com sucesso, quando se utilizou a PVS2 por 15 minutos antes da imersão em NL, apresentando média geral de 67% de sobrevivência (Figura 10A) e 89% de formação de brotos (Figura 10B).

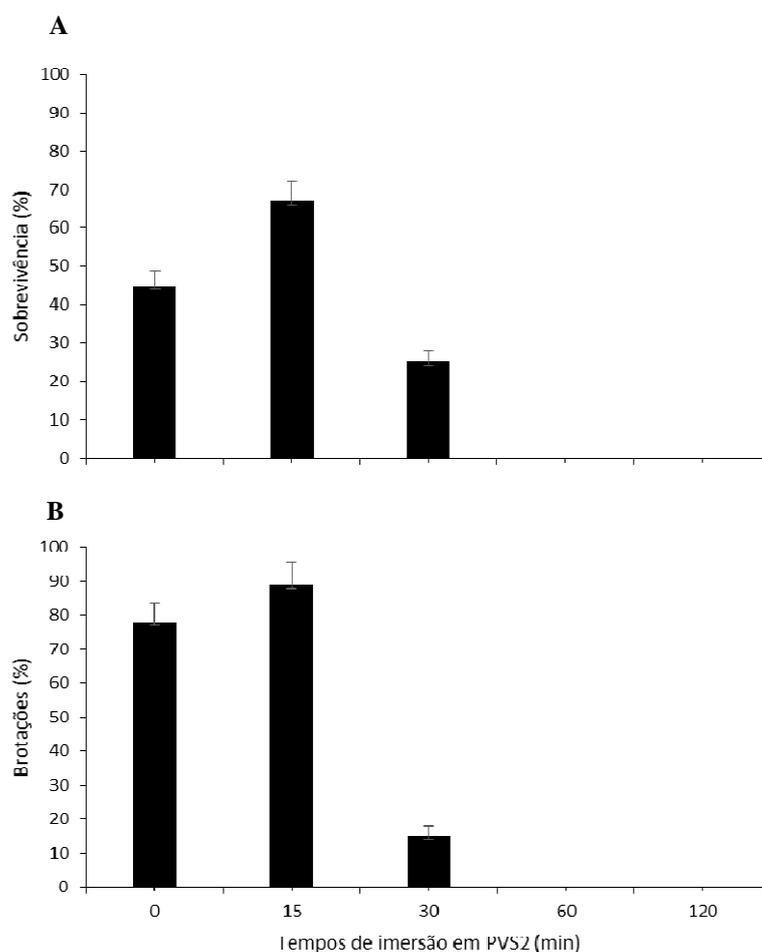


FIGURA 10 Porcentagem de sobrevivência de gemas laterais encapsuladas e expostas por diferentes períodos à solução crioprotetora PVS2 (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) antes da imersão em NL (A) e a porcentagem de formação de brotações a partir de gemas laterais encapsuladas e expostas por diferentes períodos à solução crioprotetora PVS2 (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) antes

da imersão em NL (B), aos 30 dias de cultivo *in vitro*. As barras nos gráficos representam o erro padrão da média de acordo com o teste exato de Fisher, com 5% de probabilidade.

Sabendo-se que os principais fatores limitantes à vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade química do crioprotetor, regular a concentração de crioprotetor antes da imersão dos explantes em NL pode ser uma ferramenta importante para aumentar a sobrevivência após as técnicas de criopreservação (PAPADOPOULOS et al., 2002; CASTRO et al., 2011).

Quinze minutos de exposição à PVS2 propiciou crioproteção aos explantes encapsulados, não interferindo na composição das cápsulas. A partir de 30 minutos de imersão na PVS2, as cápsulas ficaram com aspecto gelatinoso, sofrendo ruptura, sendo a provável causa do insucesso da regeneração.

Em estudos recentes, gemas laterais de mangabeira criopreservadas pela técnica encapsulamento-vitrificação não obtiveram sucesso na retomada do crescimento, com o ajuste da PVS2, utilizando-se DMSO à 5% e sacarose 0,5 M por 15 minutos, imersas em NL e reaquecidas em temperatura ambiente, esse insucesso pode ser devido à diminuição da concentração dos crioprotetores e o posterior reaquecimento em temperatura ambiente, contribuindo para a formação de gelo intracelular (SARTOR et al., 2012).

Em contrapartida, vários trabalhos têm demonstrado a eficiência da técnica encapsulamento-vitrificação (SAKAI; ENGELMANN 2007). O encapsulamento-vitrificação de meristemas apicais de Tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khenizi, em PVS2 por 15 minutos e posteriormente imersas em NL, garantiu uma maior sobrevivência e regeneração dos explantes (40%) (BOUAZIZ et al., 2013), mostrando que a concentração e tempo de exposição aos crioprotetores foi eficaz para proteger os explantes encapsulados.

CONCLUSÃO

A utilização do meio de cultivo WPM suplementado com 0,2 μ M de BAP promove as melhores taxas de regeneração de gemas laterais em mangabeira.

O pré-cultivo de gemas laterais em meio de cultivo WPM suplementado com 0,1 M de prolina por 24 horas permite altas taxas de sobrevivência após a aplicação da técnica *droplet vitrification*.

O pré-cultivo de gemas laterais encapsuladas em meio de cultivo WPM líquido com 0,75 M de sacarose combinada com 0,1 M de glicerol, por 24 horas combinada com a desidratação das cápsulas em câmara de fluxo laminar por 1 hora, possibilita as maiores taxas de sobrevivência dos explantes cultivados.

A técnica de encapsulamento-vitrificação de gemas laterais de mangabeira, utilizando-se PVS2 por 15 minutos, proporciona elevadas taxas de sobrevivência após a criopreservação.

REFERÊNCIAS

- AI, P. F.; LU, L. P.; SONG, J. J. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n. 3, p. 381-387, 2012.
- BARRACO, G. et al. Cryopreservation of *Limonium serotinum* apical meristems from *in vitro* plantlets using droplet vitrification. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.130, n.1, p.309-313, Aug. 2011.
- BARROS, D. I. et al. Método de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, jul./ago. 2006.
- BURRITT, D. J. Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications. In: KATKOV, I. I. **Current frontiers in cryopreservation**. Croatia: InTech Open Access Publisher, 2012. p. 415-426.
- 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.
- CASTRO, S. V. et al. Intracellular Cryoprotant Agents: characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 957, 2011.
- DIAS, G. M. G. et al. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.4, p.1-7, 2008.

ENGELMANN F. et al. The development of encapsulation dehydration. In: Reed BM (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer Corvalis: Springer, 2008. p. 59-75.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro & Developmental Biology**, San Diego, v. 47, n. 4, p. 5-16, 2011.

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

FLORES, R. et al. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 192-199, Aug. 2013.

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

GOMES, G. A. C. et al. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 25-30, Mar. 2010.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. **CryoLetters**, London, v. 24, n. 2, p. 85-94, Mar./Apr. 2003.

GONZALEZ-ARNAO, 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, 2008.

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**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995.

KUMAR, V.; CHANDRA, S. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production of the endangered species *Swertia chirayita*. **Biologia**, Warsaw, v. 69, n. 2, p. 186-192, 2014.

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

LOPES, K. P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 352p.

MARKOVIĆ, Z. et al. Effect of proline pretreatment on grapevine shoot-tip response to a droplet-vitrification protocol. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 2414-2417, 2013.

MARTIN, K. P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb.F.) J. D. HOOK, an endangered orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v.39, p. 322-326, 2003.

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

MEDEIROS, A. C. de S. **Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.

MELETTI, L. M. M. et al. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 6, n. 1-2, p. 13-20, 2007.

MELO, C. G. Crioconservação de germoplasma de cana-de-açúcar. 2008. Disponível em < [http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/22/TDE-2009-07-01T133647Z-1737 / Publico/texto%20completo.pdf#page=8](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/22/TDE-2009-07-01T133647Z-1737/Publico/texto%20completo.pdf#page=8) > Acesso em: 25 jun. 2014.

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, 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.

NOGUEIRA, G. F. et al. Sobrevivência de ápices caulinares de cana de açúcar após criopreservação por “droplet-vitrification”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1524-1527, nov. 2013.

OLIVEIRA, L. M. Q.; VALIO, I. F. M. Effects of moisture contention germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 69, n. 6, p. 1-5, 1992.

OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

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, 1996.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. In: ELECTRONIC FORUM ON BIOTECHNOLOGY IN FOOD AND AGRICULTURE, 13., 2005, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/C13doc.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

PAPADOPOULOS, S. et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science, Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 35-44, Nov. 2002.

PAWŁOWSKA, B.; SZEWCZYK-TARANIEK, B. Droplet vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from in situ plants. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 151-156, 2014.

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

RAVEN, P.; HAVENS, K. Ex Situ Plant Conservation and Cryopreservation: Breakthroughs in Tropical Plant Conservation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 175, n. 1, p. 1-2, 2014.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer, 2008. 513 p.

REY, M. D. S. et al. Regeneração *in vitro* de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.). **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 15, p. 1-4, jan./dez. 2009.

ROCKWELL, F. E. et al. Leaf hydraulics I: Scaling transport properties from single cells to tissues. **Journal of theoretical biology**, v. 340, p. 251-266, Jan. 2014.

SAKAI, A.; ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet- vitrification: a review. **CryoLetters**, London, v. 28, p. 151-172, 2007.

SANTOS, P. A. A. **Cultivo e conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes**. 96p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SARTOR, F. R. et al. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

SCHUCH, M. et al. Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar m-9. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 365-367, 2012.

SILVA JÚNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 1, mar. 2004.

SILVA JUNIOR, J. F. et al. Variabilidade em populações naturais de mangabeira do litoral de Pernambuco. **Magistra**, v.19, n.4, p.373-378, out./dez. 2007. (Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)),

SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 309-315, July/Sept. 2014.

SILVA, L. C. et al. Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: a woody tropical and medicinal plant species from Brazilian cerrado. **CryoLetters**, London, v. 34, n. 4, p. 338-348, July/Aug. 2013.

SLAGEREN, V. M. W. The millennium seed bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. **Journal of Arid Environments**, London, v.54, p.195-201, 2003.

SOARES, F. P. et al. 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

SUBRAMANIAM, S. et al. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium sonia* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 19, p. 3902-3907, 2013.

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

UBERTI, M. F. et al. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 3, p. 374-380, May/June 2014.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.

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, 2006.

WETZEL, M. M. V. S. et al. Conservação de germoplasma-semente a longo prazo no Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, p. 393-398, 2007.