

Resposta da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) à vitrificação em gotas

MALSCHITZKY, Sofia Amaral¹; SANTANA, Fernanda Vieira²; PEDRAL, Daniela França de Oliveira³; SILVA JÚNIOR, Josué Francisco da⁴; SILVA, Ana Veruska Cruz da⁵; LEDO, Ana da Silva⁶

¹ Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/FAPITEC-SE/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

² Engenheira Florestal, mestre em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE.

³ Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

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

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

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

Resumo - A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore nativa do Brasil, com grande importância econômica e social, ameaçada de extinção em algumas áreas de ocorrência natural. A aplicação de técnicas de criopreservação é um desafio pela natureza recalcitrante das sementes, porém necessária para sua preservação, sendo imperativa a criação de protocolos viáveis para esta planta. O objetivo do presente trabalho foi aplicar a técnica de vitrificação em gotas em explantes de mangabeira do acesso Oiteiro proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. As sementes obtidas de frutos maduros foram inoculadas em meio WPM, 0,09 M sacarose e 4% de gelificante com pH ajustado para 5,8). Os meristemas apicais foram excisados das plântulas e inoculados em meio de WPM suplementado com 0,6 M de sacarose e 4 g/L de Gelrite®, com pH ajustado a 5,8 por 24 horas. Em seguida, foram imersas em solução de carregamento contendo meio MS com 2 M glicerol e 0,4 M sacarose por 20 minutos. Na sequência foram colocados em gotas de solução crioprotetora PVS2 por 30 e 50 minutos antes de serem transferidos para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido. O delineamento foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, totalizando quatro criotubos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$, utilizando-se o software SISVAR. Os resultados apontaram que o tempo de exposição de 30 minutos é o mais indicado e há necessidade de maiores tempos de avaliação para a análise de redução das taxas de sobrevivência dos explantes.

Termos para indexação: *Hancornia speciosa* Gomes, criopreservação, cultura de tecidos de plantas.

Introdução

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore tropical nativa do Brasil da família Apocynaceae, de porte médio, encontrada no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste do país (SILVA, 2004). Seu fruto é do tipo baga, elipsóide ou arredondado (Costa et al., 2011) rica em ferro e vitamina C, propagado naturalmente por sementes e coletada de forma extrativista em Sergipe de dezembro a abril (Lima, 2010).

Sergipe é um dos maiores produtores de mangaba, juntamente com Minas Gerais e Bahia, possuindo grande importância social, econômica (Silva Junior, 2004), e cultural (Costa et al., 2011). Os produtos da mangabeira são consumidos puros e processados, em forma de geleias, sucos, sorvetes e licores, produzidos pelos próprios catadores, influenciando diretamente na sobrevivência destes trabalhadores, responsáveis por 60% de sua renda familiar anual (Lima, 2011).

Construções urbanas e práticas agrícolas são responsáveis pela devastação das árvores nativas (Santos, 2015), sendo de grande importância a conservação das espécies em bancos de germoplasma com o uso de técnicas de criopreservação (Lima, 2011).

A criopreservação é uma alternativa para conservação a longo prazo da mangabeira, devido à recalcitrância de suas sementes, sendo a vitrificação em gotas uma das técnicas mais eficientes (Santos, 2015). A solução de vitrificação PVS2 impede a cristalização e desidratação, entretanto em níveis altos de concentração ou devido ao tempo de exposição pode ser tóxico para os explantes e causar sua morte (Santos, 2015; Fuller, 2004). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de meristemas apicais do acesso Oiteiro (OI) do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba (BAG Mangaba) da Embrapa Tabuleiros Costeiros à técnica de vitrificação em gotas.

Material e métodos

A coleta dos frutos maduros “de caída” do acesso Oiteiro (OI) foi realizada no BAG Mangaba, em Itaporanga d’Ajuda, SE, durante os períodos de frutificação, de dezembro a maio. A despolpa das sementes foi realizada em laboratório de cultura de tecidos de plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros com auxílio de peneiras e Tween 20®. Em câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em álcool por 30 segundos, seguida da imersão com hipoclorito de sódio por 15 minutos, sob agitação. As sementes foram submetidas a três lavagens com água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, foi feita a inoculação das sementes em meio de germinação com WPM (Lloyd; Mccown, 1980) suplementado com 0,09 M sacarose, 4% de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 (Santos et al., 2015). As culturas (seis sementes por frasco) foram mantidas em sala de crescimento com 25°C, e fotoperíodo de 16 horas 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 30 dias. Após as excisões, os segmentos nodais foram colocados em meio de pré-cultivo (WPM + 0,6 M de sacarose e 4 g/L de Gelrite®, com pH ajustado a 5,8) por 24 horas em placas de Petri de poliestireno estéreis (SOARES, 2011). Após as 24 horas, para a realização da vitrificação em gotas, foram colocados em solução de carregamento (2 M glicerol e 0,4 M sacarose dissolvidos em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) por 20 minutos, e em seguida, imersos em gotas de Solução de Vitrificação para Plantas 2 (PVS2) por 30 e 50 minutos sobre placas de alumínio.

Os meristemas apicais foram inoculados em meio WPM com 0,3 M de sacarose por 24 horas e depois em solução de carregamento MS (Murashige; Skoog, 1962) com 2 M glicerol e 0,4 M sacarose por 20 minutos. Após o tratamento em solução de carregamento, foram dispostos em gotas de solução de vitrificação PVS2 (Sakai, 1995) composta 30% de glicerol (v/v), 15% de etilenoglicol (v/v) e 15 % de dimetil sulfóxido (DMSO) (v/v) e sacarose 0,4 mol L⁻¹ sobre placas de alumínio, por 30 e 50 minutos. Dado o tempo de exposição ao PVS2, as gotas com os explantes foram imersas em nitrogênio líquido dentro de criotubos de 2 mL por 30 minutos. Para o reaquecimento os explantes foram colocados em solução de descarregamento (WPM, 1,2 M de sacarose) em temperatura ambiente por 15 minutos (Santos et al., 2015). Após reaquecidos, foram inoculados em meio de pós cultivo (WPM com 0,3 M de sacarose, 20 ppm de ácido ascórbico, 2,2 g/L de Gelrite® e pH ajustado a 5,8) e mantidos no escuro por 24 horas. Após as 24 horas, foram trocados para meio de regeneração (WPM, 0,09 M de sacarose, 2 mg/L de BAP, 20 ppm de ácido ascórbico e 2,2 g/L de Gelrite®), mantido por seis dias no escuro antes de transferido para 12 horas de fotoperíodo, 70% de umidade relativa do ar. As avaliações de sobrevivência dos explantes foram feitas 30 e 60 dias após a inoculação.

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, totalizando quatro criotubos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$, utilizando-se o software SISVAR.

Resultados e discussão

Não houve diferença significativa entre os tempos de exposição ao PVS2 na sobrevivência dos meristemas apicais aos 30 e 60 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Percentagem de sobrevivência e regeneração de meristemas apicais do acesso de mangabeira Oiteiro (OI) em função do tempo de exposição ao PVS2 após a criopreservação. 2020.

Tempo exposição (min)	Sobrevivência (%) aos 30 dias NL+	Sobrevivência (%) aos 30 dias Controle NL-	Sobrevivência (%) aos 60 dias NL+	Sobrevivência (%) aos 30 dias Controle NL-
30	75,00a	100	31,25a	75,00
50	75,50a	100	37,50a	75,00

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A regeneração só foi observada no tempo de exposição de 50 minutos na solução crioprotetora PVS2, mesmo com valores baixos 12,50% (dados não apresentados). Santos et al. (2015) trabalhando com vitrificação em gotas de mangabeira alcançou 45% de regeneração com 15 min de PVS2. A alta concentração de sacarose dos meios pode ser uma das razões para as taxas altas de sobrevivência mesmo com o uso do PVS2, servindo como protetor contra desidratação dos tecidos durante a criopreservação

(Burrill, 2008). O estudo realizado por Santos et al. (2015) demonstrou que a exposição de 15 minutos ao PVS2 não foi suficiente para proteger os ápices caulinares dos efeitos deletérios do nitrogênio líquido.

As taxas de viabilidade dos explantes com a utilização de técnicas de vitrificação em gotas demonstra a importância da técnica para a conservação a longo prazo das mangabeiras, assim como outras espécies nativas, especialmente com sementes recalcitrantes (Santos et al., 2015).

Conclusão

A técnica de vitrificação em gotas pode ser aplicada para a conservação a longo prazo da mangabeira, entretanto são necessários mais estudos com a variação do tempo de exposição para alcance de maior sobrevivência.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe-FAPITEC/SE.

Referências

- BURRITT, D. J. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x Erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 95, p. 209, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9434-5>.
- COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C. da; LEDO, A. da S.; SANTOS, A. R. F. dos; SILVA JUNITO, J. F. da. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, 499-508, 2011.
- FULLER, B. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state, **Cryo Letters**, v. 25, n. 6, p.375-88, 2004.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. **HortScience**, v. 16, p. 453, 1981.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1995. p. 53-69. (Agriculture, 32). https://doi.org/10.1007/978-3-662-03096-7_3.
- SANTOS, P. A. A.; PAIVA, R.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. C. de; SANTANA, M. C. de; SILVA, D. P. P. C. da. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 289-296, 2015.
- SILVA JUNIOR, J. F. da. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 2004.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, G. D. R. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev. 2011.