

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS DE MANGABEIRA: O PAPEL DA PROLINA

Débora de Oliveira Prudente¹, Renato Paiva², Fernanda Carlota Nery³, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁴, Michele Valquíria dos Reis⁵, Luciano Coutinho Silva^{6*}

1. Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras (UFLA).
2. Docente. Departamento de Biologia - UFLA.
3. Docente. Departamento de Engenharia de Biosistemas. Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ).
4. Docente. Departamento de Agricultura - UFLA.
5. Pós-Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal - UFLA.
6. Docente. Departamento de Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba (UFP). *Correspondência: Centro de Biotecnologia, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa-PB, Brasil. CEP 58051-900. E-mail: lucoutsilva@yahoo.com.br

RESUMO

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) espécie frutífera nativa do Brasil possui potencial econômico para exploração de fármacos ou produção de frutos. Entretanto, a espécie apresenta baixa taxa de germinação e sementes recalcitrantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito da prolina em modificar a etapa de pré-cultivo de gemas laterais antes da criopreservação. As gemas foram extraídas de brotações de mangabeira cultivadas *in vitro* e 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) e por diferentes tempos (24 e 48 horas). Após o pré-cultivo, as gemas foram tratadas com PVS2 a 0 °C por 15 minutos e criopreservadas por *droplet vitrification*. Após a criopreservação, as amostras foram reaquecidas e as gemas cultivadas em meio WPM contendo 0,2 µM de BAP em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h. Após 30 dias de cultivo foram avaliados a sobrevivência e a regeneração de brotos pelo teste de Skott-knott ($P \leq 0,05$). O pré-cultivo em 0,3 M de sacarose + 0,1 M de prolina por 24 horas promoveu um significativo aumento na porcentagem de sobrevivência (83,3%) e regeneração de brotações (93,3%).

Descritores: *Hancornia sp.*, Conservação em longo prazo, *Droplet vitrification*, Solutio compatível.

CRYOPRESERVATION OF MANGABEIRA AXILLARY: THE HOLE OF PROLINE

ABSTRACT

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) fruit species native of Brazil has economic potential for exploitation of drugs or fruit production. However, the species has a low germination rate and recalcitrant seeds. In this context, the objective of this study was to test the effect of proline modify the step of pre-cultivation of lateral gems before cryopreservation. The gems were extracted from shoots grown *in vitro* mangabeira and pre-grown in WPM culture medium supplemented with 0.3 M sucrose combined with different concentrations of proline (0.0, 0.1, 0.2 and 0.3 M) and for different times (24 and 48 hours). After the pre-cultivation the shoots were treated with PVS2 at 0 °C for 15 minutes and cryopreserved by *vitrification droplet*. After cryopreservation, the samples were reheated and gems cultivated in WPM containing 0.2 µM BAP in a growth chamber with a 16h photoperiod. After 30 days of culture were evaluated survival and regeneration of shoots by Skott-Knott test ($p \leq 0.05$). The preculture in 0.3 M sucrose + 0.1 M proline for 24 hours caused a significant increase in the percentage of survival (83.3%) and regeneration of shoots (93.3%).

Keywords: *Hancornia sp.*, Conservation in the long term, *Droplet vitrification*, Solutio compatible.

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 (1). Seus frutos possuem aroma e sabor agradáveis, e são utilizados na produção de xaropes, sucos, doces, sorvetes e compotas (2). É uma fruta rica em ferro e fonte de vitamina C, o que lhe garante uma posição de destaque entre os alimentos funcionais (3). Além disso, a espécie apresenta propriedades medicinais com constituintes de potencial anti-hipertensivo e quimiopreventivo para o câncer (4). Entretanto, a espécie é alvo de extrativismo predatório o que diminui sua ocorrência natural em áreas nativas, além da quantidade de frutos para consumo humano. Outro fator importante é a baixa porcentagem de germinação das sementes, devido a produção de compostos fenólicos na polpa que antagonizam o efeito de auxinas, giberelinas e citocininas (5), além da recalcitrância de suas sementes, inviabilizando o armazenamento convencional (6-8).

A conservação de germoplasma in situ ou ex-situ são muito utilizadas para evitar o risco de extinção de espécies vegetais além de permitir que vários genótipos estejam disponíveis para utilização futura (9). Na conservação ex situ podemos citar a criopreservação de estruturas reprodutivas, como embriões e meristemas em nitrogênio líquido (NL) (10). Nessas condições, 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 (11). Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre alguma delas é dependente da espécie e do explante a ser criopreservado (15). 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 Plant Vitrification Solution² (PVS²) e então imersos em NL (11). Este procedimento permite taxas de resfriamento ultra-rápidas, diminuindo a formação de cristais de gelo, prejudiciais à célula (16).

Cuidados nas etapas iniciais durante o processo de criopreservação, também são essenciais para garantir o sucesso da técnica, como 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 (17).

A prolina é 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 e estresses provocados pelo frio. Pode ser adicionada em alguns protocolos de criopreservação, nas soluções crioprotetoras ou utilizada na fase de pré-cultivo dos explantes. O objetivo da adição deste soluto compatível é o de maximizar a sobrevivência dos explantes criopreservados (18). Além disso, a prolina também tem efeito antioxidante, ajudando a combater espécies reativas de oxigênio (EROs) que geralmente surgem após a desidratação celular (19).

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 (20). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o pré-cultivo de gemas laterais de mangabeira em altas concentrações de prolina.

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.

Material vegetal

Como fonte de gemas laterais foram utilizadas brotações de mangabeira, previamente multiplicadas *in vitro* em meio de cultivo *Wood Plant Medium* (WPM) (21), Suplementado com 8,87 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,09 M de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar e pH de 5,8 (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 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 transferidas para o 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 e pH de 5,8. 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.

Estatística

Foram utilizadas 30 repetições por tratamento e os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (22), comparando as frequências pelo teste de Skott-Knott com probabilidade de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da prolina no pré-cultivo de gemas

Houve efeito significativo para a interação da concentração de prolina e tempo. O pré-cultivo de gemas laterais em meio de cultivo WPM contendo 0,1 M de prolina por 24 horas aumentou em aproximadamente 30% a sobrevivência dos explantes quando comparado com o tratamento controle, apresentando 83,3% de sobrevivência (Figura 1A) e aumentou em aproximadamente 20% a porcentagem de regeneração de brotações quando comparado com o tratamento controle, apresentando 93,3% de formação de brotações (Figura 1B). Porém, a interação de 0,2 e 0,3 M de prolina com o tempo diminuiu significativamente a porcentagem de sobrevivência dos explantes após a criopreservação. A morte celular após o processo de criopreservação pode ser causada por numerosos fatores em vez de um único mecanismo (30). Neste estudo, pode ter ocorrido uma alta concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos, causando a desnaturação de ácidos nucleicos e membranas (31).

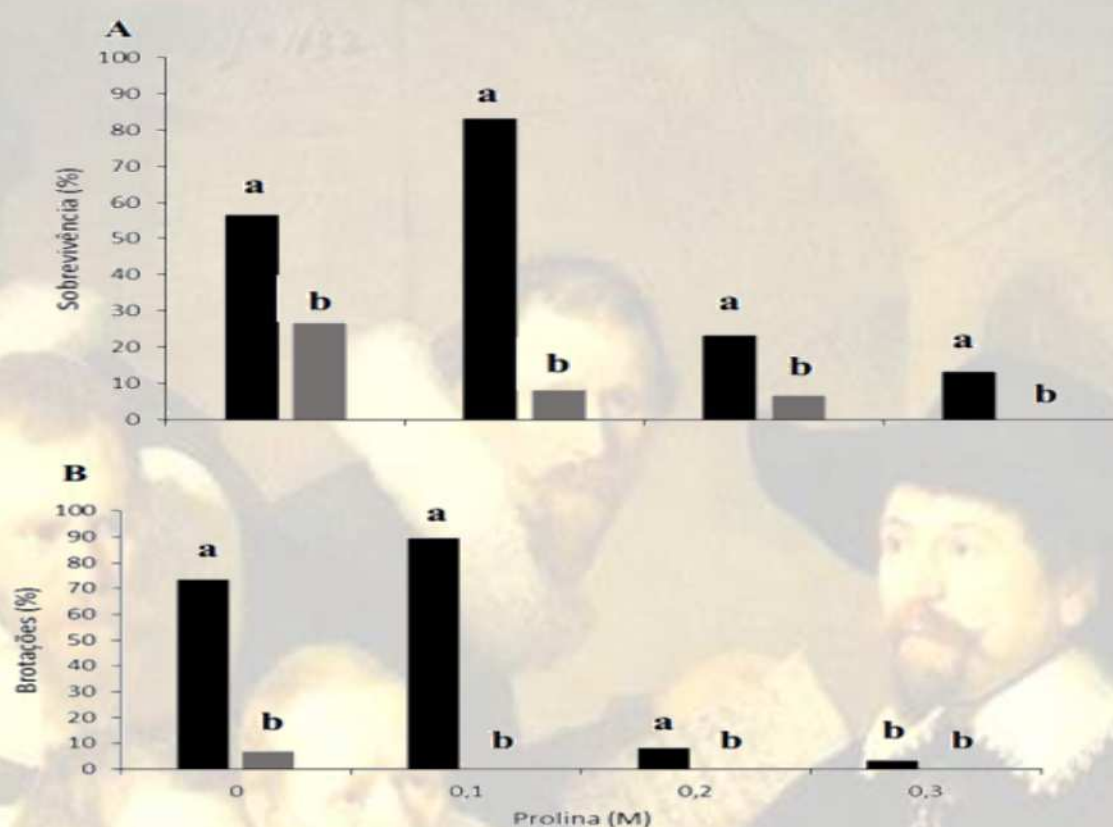


Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência (A) e de regeneração (B) de gemas laterais de mangabeira pré-cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de prolina (0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 M) por diferentes tempos (24 e 48 horas). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração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

Após 30 dias da inoculação foi possível observar a regeneração das gemas laterais onde a utilização de 0,1 M de prolina também permitiu a obtenção de brotações com emissão de folhas verdes e mais uniformes (Figura 2B). Também pode ser observado que a formação de calos na base das gemas no tratamento de 0,1 M de prolina por 24 horas foi menor que nos outros tratamentos (Figura 2A, 2C e 2D).



Figura 2 - Aspecto visual de gemas laterais aos 30 dias de cultivo in vitro em meio WPM suplementado com 0,2 μ M de BAP, após o pré-cultivo na ausência de prolina (A); 0,1 M prolina, evidenciando a parte aérea (seta) (B); 0,2 M prolina (C); e 0,3 M prolina (D). Barra= 0,5 cm.

O meio de pré-cultivo é acrescido de alta concentração de sacarose (0,3 M), o que promove a redução do conteúdo de água dos explantes por desidratação (efeito osmótico). Assim, 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 (25). 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 (26). Ajudando a manter a estrutura celular intacta, o que lhes permitirá retornar às suas atividades normais após o descongelamento (23, 24, 30).

O impacto do pré-cultivo no metabolismo de explantes criopreservados foi estudado em meristemas de banana por meio de eletroforese em gel 2-D (24). Estes autores demonstraram que o pré-cultivo foi capaz de alterar a expressão de genes que são essenciais para a aquisição de tolerância ao congelamento. Desse modo, o acúmulo de prolina, antes do congelamento de explantes em NL, pode atuar minimizando os efeitos deletérios do estresse osmótico grave e das baixas temperaturas (28), pois, entre outras coisas, contribui para a estabilização do equilíbrio e manutenção do potencial redox celular, garantindo a homeostase quando o transporte de elétrons está saturado em condições adversas (29).

Os resultados obtidos nesse estudo em meio de pré-cultivo contendo 0,1 M de prolina, foram semelhantes aos observados em gemas laterais de videira (*Vitais vinífera*

L. c.v. Portam) cultivadas em meio de pré-cultivo MS (27) acrescido de 50 μ M de prolina (19).

Confirmando que a criopreservação é uma ferramenta promissora para o sucesso da criação de bancos de germoplasma em que o material vegetal adequado está prontamente disponível para a rápida regeneração e distribuição.

CONCLUSÃO

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 *drops vitrification*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1- Silva Junior JF, Xavier FRS, Léo CAS, Musser RS, Léo AS. Variabilidade em populações naturais de mangabeira do litoral de Pernambuco. *Magistra*. 2007; 19-4:373-378.
- 2- Soares FP, Paiva R, Alvarenga AD, Nery FC, Vargas DP, Silva DRG. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citolisina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011; 35-1:152-157.
- 3- Silva Júnior JF. A cultura da mangaba. 1ª ed. *Revista Brasileira de Fruticultura*; 2004.
- 4- Serra CP, Côrtes SDF, Lombardi JA, Braga de Oliveira A, Braga FC. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*. 2005; 12-6:424-432.
- 5- Medeiros ACS. Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas. Colombo: Embrapa Florestas; 2001.
- 6- Oliveira LMQ, Valio IFM. Effects of moisture content on germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *Annals of Botany*. 1992; 69-6:1-5.
- 7- Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum; 2000.
- 8- Barros DI, Bruno RDLA, Nunes HV, Cabral GC, Pereira WE, Mendonça RMN. Método de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2006; 28-1:25-27.
- 9- Flores R, Uliana SC, Pimentel N, Garlet TMB. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2013; 4-3:192-199.
- 10- Lopes KPAC, Almeida F, Carvalho JMLA, Bruno R. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*. 2013; 17-3:291-298.
- 11- Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro & Developmental Biology*. 2011; 47-4:5-16.
- 12- Meletti LMM, Barbosa W, Veig, RFA, Pio R. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agraria Paranaensis*. 2007; 6-2:13-20.
- 13- Reed BM. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Berlin: Springer, 2008.
- 14- Kaczmarczyk A, Turner SR, Bunn E, Mancera RL, Dixon KW. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2011; 47-1:17-25.

- 15- Panis B, Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. In: Eletronic forum on biotechnology in food and agriculture, 13., 2005, Rome. Proceedings... Rome: FAO, 2005.
- 16- Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004; 25-6:375-388.
- 17- Castro SV, Carvalho ADA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues AP R. Intracellular Cryoprotant Agents: characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011; 39-2:957.
- 18- Burritt DJ. 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.
- 19- Marković Z, Chatelet P, Peyrière A, Preiner D, Engelmann-Sylvestre I, Kontić JK, Engelmann F. Effect of proline pretreatment on grapevine shoot-tip response to a droplet-vitrification protocol. *American Journal of Plant Sciences*. 2013; 4-12:2414-2417.
- 20- Raven P, Havens K. Ex Situ Plant Conservation and Cryopreservation: Breakthroughs in Tropical Plant Conservation. *International Journal of Plant Sciences*. 2014; 175-1:1-2.
- 21- Lloyd G, Mccown B. Use of micro culture for production and improvement of *Rhododendro spp.* *HortScience*. 1980; 15-3:416.
- 22- Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011; 35-6:1039-1042.
- 23- Panis B, Totte N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R. Cryopreservation of banana (*Musa spp.*) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science*. 1996; 121-1:95-106.
- 24- Carpentier SC, Vertommen A, Swennen R, Witters E, Fortes C, Souza Jr MT, Panis B. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems. *Journal of proteome Research*. 2010; 9-10:5038-5049.
- 25- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaaniboni Filho EAND, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*. 2003; 63-2:472-489.
- 26- Uberti MF, Vieira FDN, Salência HR, Vieira GDS, Vinatea LA. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014; 57-3:374-380.
- 27- Murashige T, Skoog FA. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15:473-497.
- 28- Pocięcha E, Płazek A, Janowiak F, Zwierzykowski Z. ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2008; 73-6:126-132.
- 29- Szabados L, Saviouré A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*. 2010; 15-2:89-97.
- 30- Vendrame W, Faria RTD, Sorace M, Sahyun SA. Orchid cryopreservation. *Ciência e Agrotecnologia*. 2014; 38-3:213-229.
- 31- Santos, IRI. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 2000; 12:70-84.