

## CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS DE MANGABEIRA: O PAPEL DA PROLINA

Débora de Oliveira Prudente<sup>1</sup>, Renato Paiva<sup>2</sup>, Fernanda Carlota Nery<sup>3</sup>, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva<sup>4</sup>, Michele Valquíria dos Reis<sup>5</sup>, Luciano Coutinho Silva<sup>6\*</sup>

1. Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras (UFLA).
2. Docente. Departamento de Biologia - UFLA.
3. Docente. Departamento de Engenharia de Biossistemas. 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 têm 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  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,09 M de sacarose, 7  $\text{g L}^{-1}$  de ágar e pH de 5,8 (2).

### Pré-cultivo de gemas laterais

Gemas laterais com aproximadamente 1  $\text{mm}^2$  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  $\mu\text{M}$  de BAP, 0,09 M de sacarose, 0,4  $\text{g L}^{-1}$  de PVP, gelificado com 7  $\text{g L}^{-1}$  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  $25 \pm 2$  °C. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo foram porcentagem de sobrevivência e porcentagem de formação de brotações.

### **Estatística**

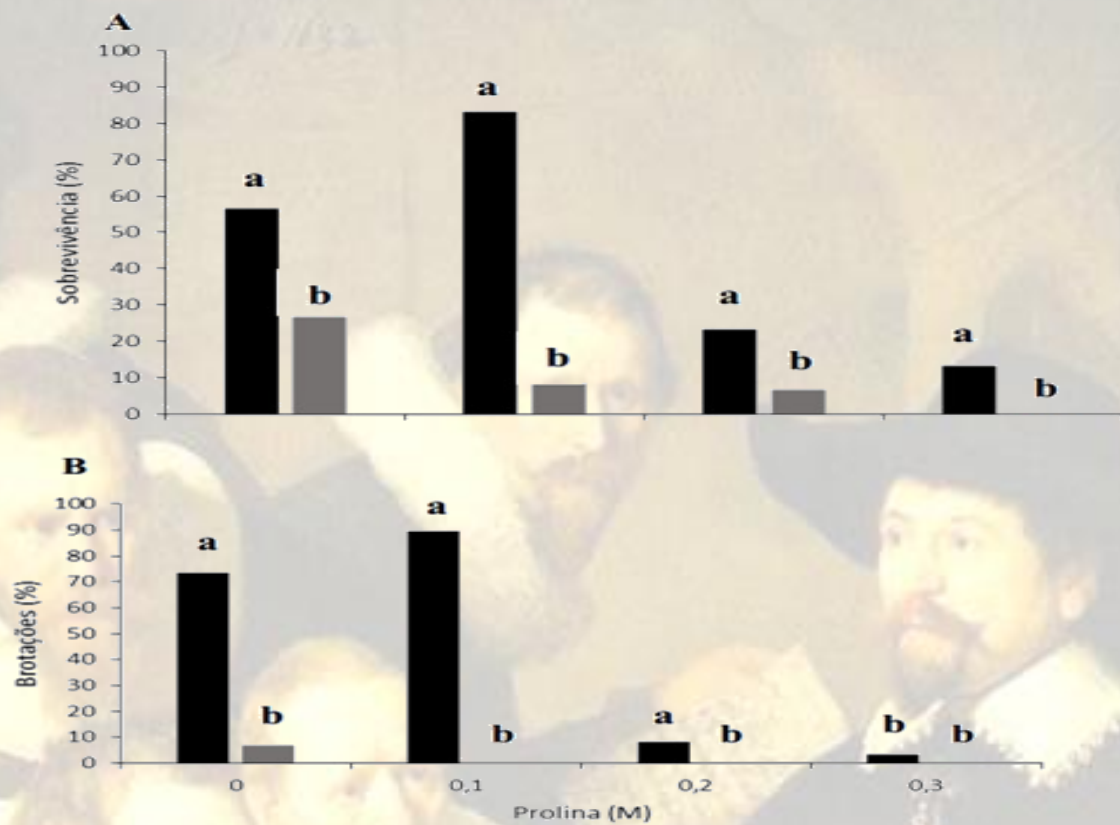
Foram utilizadas 30 repetições por tratamento e os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (22), comparando as frequências pelo teste de Skott-Knott com probabilidade de 5%.

## **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  $\mu$ 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 (*Vitis vinifera*



L. c.v. Portam) cultivadas em meio de pré-cultivo MS (27) acrescido de 50  $\mu$ 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 *drope 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.