



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS TROPICAIS

FERNANDA VIEIRA SANTANA

2018



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

FERNANDA VIEIRA SANTANA

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS TROPICAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de –Mestre em Ciências.

Orientador
Prof.^a Dr.^a Ana da Silva Lédo
Coorientador
Prof. Dr. Paulo Augusto Almeida Santos

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S232c Santana, Fernanda Vieira.
Criopreservação de espécies frutíferas tropicais / Fernanda
Vieira Santana; orientadora Ana da Silva Lédo. – São Cristóvão,
2018.
44 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)–
Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Frutas tropicais. 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc.
3. Côco. 4. Mangabeira. 5. Germoplasma vegetal – Recursos. I.
Lédo, Ana da Silva, orient. II. Título.

CDU 634.6

FERNANDA VIEIRA SANTANA

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS TROPICAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de -Mestre em Ciências

APROVADA em 27 de julho de 2018.

Prof.^a Dr.^a Ana Veruska Cruz da Silva
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS

Prof.^a Dr.^a Kicia Karinne Pereira Gomes-
Copeland
Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Ana da Silva Léo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS
(Orientadora)

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL**

*A Deus, minha vovó Maria (i.m.) e familiares.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não ter me deixado desistir, sempre me dando força e coragem para seguir em frente e concluir o meu objetivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por fornecer estrutura e recursos necessários para a consolidação desse trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe, em especial ao PPGAGRI pela oportunidade.

À minha orientadora, Dr.^a Ana Lédo, por todos os ensinamentos transmitidos, sendo sempre atenciosa e disposta a ajudar. Agradeço por ter acreditado em mim e me apoiado nessa jornada, guardarei com carinho a experiência vivida e não me esquecerei do quanto foi fundamental para o meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Paulo Augusto Santos, pela atenção, disposição e colaboração no trabalho.

À Dr.^a Ana Veruska e Dr.^a Kicia Gomes-Copeland por contribuírem para o enriquecimento desse trabalho.

À Inácio Roque, pelos ensinamentos no laboratório e apoio necessários para que tudo ocorresse bem. Agradeço pela ajuda e conselhos em todos os momentos que precisei!

Aos amigos do LABCULT e agregados: Annie, Carol, Leila, Bella, Josi, Milena, Cynthia e Lucas. Sou muito grata a Deus por ter conhecido vocês, uma equipe unida e acolhedora que me recebeu de braços abertos. Esses dois anos foram mais fáceis graças a nossa convivência, tenho certeza que fiz amizades que levarei para o resto da vida. Agradeço por estarem comigo compartilhando momentos tão especiais. Obrigada de coração!

Às minhas queridas amigas Allana, Alyne e Tássia que me acompanham desde a graduação e vivem esse sonho comigo. Agradeço pelo apoio, carinho e cumplicidade!

Ao meu namorado, Rodrigo Pina, que sempre esteve disposto a me ajudar, ouvir e encorajar. Obrigada por me transmitir confiança e ser meu companheiro em todas as horas.

Ao meu pai, José Marcelo, por todo carinho, incentivo e amor. Por sempre acreditar na minha capacidade e incentivar meus sonhos, estando sempre ao meu lado em todos os momentos. Agradeço por ser um exemplo para mim e o motivo de eu querer crescer ainda mais nessa vida. Te amo!

Aos meus familiares, em especial as minhas tias e primas queridas, que torcem pelas minhas vitórias e comemoram cada passo do meu sucesso.

Ao meu irmão, Victor Santana, e meus sobrinhos que ainda nem sabem ler, mas representam uma fonte de estímulo na minha vida!

A todos os amigos do PPGAGRI que fiz durante essa caminhada e aqueles que não foram citados, mas que já faziam parte da minha vida, sempre me apoiando e encorajando a alcançar meus sonhos. Obrigada por estarem comigo!

Enfim, sou grata a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos gerais do coqueiro	3
2.2 Aspectos gerais da mangabeira.....	3
2.3 Conservação de recursos genéticos.....	4
2.4 Conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas tropicais	6
2.5 Aplicação da criopreservação na conservação em longo prazo de espécies frutíferas	7
4. ARTIGO 1: CRIOPRESERVAÇÃO DE PLÚMULAS DE COQUEIRO ANÃO VERDE DO BRASIL DE JIQUI POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS.....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
4.1. Introdução	22
4.2. Material e Métodos	23
4.2.1. Coleta, assepsia e isolamento do material vegetal.....	23
4.2.2. Pré-cultura, crioproteção, criopreservação, descongelamento e regeneração	23
4.2.3. Análises histológicas	24
4.2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas	24
4.3. Resultados e Discussão	24
4.3.1. Efeito da solução crioprotetora e tempo de exposição na sobrevivência e indução de calos em plúmulas de coqueiro AVeBrJ não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL).....	24
4.3.2. Análises histológicas	27
4.4. Conclusões	29
4.5. Referências Bibliográficas.....	29
5. ARTIGO 2: EFEITO DO TEMPO DE DESSECAÇÃO NA UMIDADE DE SEMENTES E REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES DE MANGABEIRA.....	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
5.1 Introdução	34
5.2 Material e Métodos	35
5.2.1 Material Vegetal.....	35

5.2.2	Efeito do tempo de dessecação na umidade e viabilidade de sementes de mangabeira	35
5.2.3	Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de embriões de mangabeira criopreservados	36
5.2.4	Análises estatísticas	36
5.3	Resultados e Discussão	36
5.3.1	Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de frutos maduros e verde-maduros de mangabeira.....	36
5.3.2	Efeito do tempo de dessecação na germinação e crescimento de embriões de mangabeira não criopreservados	37
5.3.3	Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de embriões de mangabeira criopreservados	40
5.4	Conclusões	42
5.5	Referências bibliográficas.....	42

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1		Página
Figura		Página
1	Desenvolvimento de calos embriogênicos em plúmulas não criopreservadas e criopreservadas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui. A- calos com coloração creme amarelada; B- estrutura tipo -orelhall (<i>eo</i>); C- estruturas globulares (<i>eg</i>).....	26
2	Seções histológicas de calos da cultura do coco formados antes (A e B) e após a criopreservação (C e D) da plúmula utilizando PVS2. A- Seção de calo embriogênico mostrando o embrião somático globular (ESG). B- Seção de calo embriogênico mostrando a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD). C- Seção de calo embriogênico mostrando a presença de células meristemáticas (CM). D- Seção de calo embriogênico mostrando a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD). Barra de escala = 100 μ m.....	28
ARTIGO 2		
Figura		Página
1	Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de frutos de mangabeira	37
2	Efeito do tempo de dessecação na germinação de embriões zigóticos de frutos de mangabeira	38
3	Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento de plântulas de mangabeira obtidas de frutos maduros (de caída) e verde-maduros (de vez) aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . A- comprimento da parte aérea; B- comprimento da raiz e C- número de folhas	39
4	Regeneração de embriões zigóticos e crescimento de plântulas de mangabeira obtidas de frutos maduros (de caída) e verde-maduros (de vez) após diferentes tempos de dessecação, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	40
5	A- Embriões zigóticos não criopreservados com coloração esverdeada e início de regeneração; B- Embriões zigóticos criopreservados com coloração branca característica após a excisão	41

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB) e de calogênese (%CALO) de plúmulas não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL) de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui em função da solução crioprotetora e tempo de exposição ¹	24
2	Médias ¹ da porcentagem de sobrevivência aos 30 dias e de calogênese aos 60 dias em plúmulas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL) em função da solução crioprotetora ^{2,3} e tempo de exposição.....	27

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Médias ¹ da umidade e porcentagem de germinação de embriões zigóticos de mangabeira em função do estágio de maturação dos frutos.....	37
2	Médias ¹ comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR) e do número de folhas (NF) de plântulas oriundas de embriões zigóticos de mangabeira em função do estágio de maturação dos frutos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FAA	Formalina, ácido acético e álcool etílico
BAP	Benzilaminopurina
MS	Meio de cultura estabelecido por Murashige & Skoog (1962)
PVS2	<i>Plant Vitrification Solution 2</i>
PVS3	<i>Plant Vitrification Solution 3</i>
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
+NL	Material imerso em nitrogênio líquido
-NL	Material não imerso em nitrogênio líquido
AVeBrJ	Coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui
Y3	Meio de cultura estabelecido por Eeuwens (1975)

RESUMO

SANTANA, Fernanda Vieira. **Criopreservação de espécies frutíferas tropicais**. São Cristóvão: UFS, 2018. 44p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O Brasil é o país com maior biodiversidade no mundo, além de apresentar condições favoráveis, como clima e solos férteis que possibilitam o cultivo de diversas espécies. A conservação dos recursos genéticos vegetais dessas espécies, tanto nativas quanto exóticas, em alguns casos, tem sido tratada como uma ação prioritária necessária em diversas instituições de pesquisa. O coqueiro e a mangabeira são exemplos de espécies frutíferas que apresentam potencial econômico devido à ampla possibilidade de uso dos seus frutos. Podem ser consumidos *in natura* ou industrializados, fornecendo uma variedade de produtos utilizados, principalmente, na alimentação humana e na indústria farmacêutica e/ou cosmética. Especialmente na região Nordeste, essas fruteiras representam uma fonte de renda para famílias que tem como base a agricultura sustentável ou praticam a atividade extrativista. São espécies recalcitrantes, cuja conservação de seus recursos genéticos é baseada, principalmente, em coleções de campo, já que não toleram a desidratação necessária para o armazenamento em baixas temperaturas. Nesse sentido, a aplicação das técnicas de criopreservação funciona como alternativa aos métodos de conservação já existentes. O processo consiste na conservação do material vegetal em temperatura ultrabaixa em nitrogênio líquido a -196 °C, na qual todas as atividades são paralisadas, como divisão celular e reações metabólicas, permitindo o armazenamento do material vegetal por longos períodos e a conservação da variabilidade genética existente. O objetivo do trabalho foi aprimorar o conhecimento técnico-científico para a conservação de explantes de coqueiro e mangabeira por meio das técnicas de criopreservação. Observaram-se diferenças significativas na porcentagem de calogênese para a interação entre soluções e tempo de exposição para as culturas não criopreservadas (-NL) e para o tempo de exposição após a criopreservação (+NL). O PVS2 e o PVS3 combinados com 15 minutos promoveram a maior formação de calo (70 e 100%, respectivamente) nas culturas de controle. O tempo de exposição de 30 min, independente da solução de vitrificação, promoveu 30% da formação de calos embriogênicos em plúmulas de coqueiro após a criopreservação. Esses resultados contribuem para a conservação em longo prazo do coqueiro. Sementes oriundas de frutos maduros de mangabeira apresentam maior porcentagem de germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas. Os tempos de dessecação afetam as variáveis de crescimento de plântulas oriundas de sementes de frutos de vez e maduros. As técnicas de dessecação e vitrificação não promovem a sobrevivência e regeneração de embriões zigóticos de mangabeira após a criopreservação. Estudos complementares devem ser conduzidos para obtenção da regeneração a partir de sementes criopreservadas de mangabeira.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L., *Hancornia speciosa* Gomes, Conservação, Recursos genéticos.

* Comitê Orientador: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS (Orientador), Paulo Augusto Almeida Santos – UFS (Coorientador).

ABSTRACT

SANTANA, Fernanda Vieira. **CRYOPRESERVATION OF TROPICAL FRUIT SPECIES**. São Cristóvão: UFS, 2018. 44 p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Brazil has the greatest biodiversity in the world and presents favorable conditions for the cultivation of several species, such as climate and fertile soils. The conservation of plant genetic resources of both native and exotic species, in some cases, has been treated as a priority action in several research institutions. Coconut and mangaba tree are examples of fruit species of economic potential due to the extensive usage possibility of their fruits. Both *in natura* or industrialized products can be consumed, providing a variety of products used mainly in human food and in the pharmaceutical and/or cosmetics industry. Especially in the Northeast, these fruit trees represent a source of income for families that rely on the sustainable agriculture or the extractive activity. They are recalcitrant species, and the conservation of their genetic resources is based, mainly, on field collections since they do not tolerate the dehydration necessary for storage at low temperatures. In this sense, the application of cryopreservation techniques works as an alternative to the existing conservation methods. The process consists of conserving the plant material at an ultra-low temperature in liquid nitrogen, at -196 °C. At this temperature, all activities are paralyzed, such as cell division and metabolic reactions, allowing the storage of the plant material for longer periods and the conservation of the existing genetic variability. The objective of this work was to improve the technical-scientific knowledge for the conservation of coconut and mangaba tree explants using cryopreservation techniques.

Key-words: *Cocos nucifera* L., *Hancornia speciosa* Gomes, Conservation, Genetic Resources.

* Supervising Committee: Ana da Silva Lédo – Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS (Advisor), Paulo Augusto Almeida Santos – UFS (Co-advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma frutífera de origem asiática pertencente à família Arecaceae e ao gênero *Cocos*, que é constituído apenas por uma espécie e composto por duas principais variedades: *Typica* (variedade gigante) e *Nana* (variedade anã). A variedade gigante caracteriza-se por sua rusticidade e rápido crescimento, atingindo até 30 metros de altura. A variedade anã é autógama, atingindo de 10 a 12 metros de altura, com vida útil entre 30 e 40 anos e composta pelas cultivares amarela, verde e vermelha. Essa espécie apresenta ampla ocorrência, distribuindo-se em praticamente todos os continentes, sendo uma das frutíferas mais difundidas no mundo. Seu cultivo ocorre de forma expressiva devido à possibilidade de obtenção dos mais variados produtos, tanto de forma *in natura* quanto industrializada (SILVA, 2016).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie frutífera nativa do Brasil, de ampla ocorrência, principalmente na região Nordeste, e que apresenta grande potencial socioeconômico devido à variedade de usos. Caracteriza-se por ser uma árvore de porte médio, podendo chegar até 25 metros de altura, com frutos que possuem sabor característico e agradável, sendo utilizados na agroindústria para fabricação de polpas de sucos, sorvetes e geleias. Além de apresentar importância no ramo alimentício, a mangabeira também possui aplicação medicinal, ornamental e melífera. É considerada uma espécie promissora para o mercado nacional devido ao alto teor de proteína de seus frutos, entretanto, sua exploração ainda é realizada de forma extrativista (LOBO et al., 2008; VIEIRA, 2011).

A conservação do germoplasma dessas espécies é de grande importância devido ao potencial econômico apresentado e manutenção da variabilidade genética existente. Algumas instituições de pesquisa já disponibilizam recursos e investem em pesquisas para a manutenção dessa variabilidade genética. A conservação por bancos de sementes é atualmente a estratégia mais comum e utilizada na conservação de germoplasma vegetal, porém as coleções de campo estão sujeitas a ataques de pragas e problemas ambientais, entre outros fatores que promovem riscos à manutenção do germoplasma (SILVA et al., 2006).

Além disso, essas frutíferas apresentam sementes recalcitrantes, o que inviabiliza sua conservação pelos métodos tradicionais, por apresentarem sensibilidade à dessecação e baixas temperaturas, dificultando o seu armazenamento. As sementes de mangabeira perdem o seu poder germinativo após 34 horas (SOARES et al., 2015), impedindo a conservação por banco de sementes. Já o coqueiro, além da recalcitrância, possui sementes que apresentam tamanho, volume e peso que inviabilizam sua conservação pelo método convencional e o intercâmbio de germoplasma. Além disso, estudos indicam a irregularidade nos rendimentos de germoplasma de coco, introduzido por discos de endosperma e altas porcentagens de contaminações (CARVALHO et al., 2006; SOARES et al., 2007; N'NAN et al., 2008).

Dessa forma, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas para a conservação *in vitro*, é estratégia complementar à conservação da variabilidade genética existente e permite acelerar a multiplicação de genótipos promissores (PILATTI et al., 2011). Diversas técnicas de criopreservação têm sido empregadas para a conservação do material vegetal *in vitro*. A criopreservação por meio do armazenamento do material em nitrogênio líquido à temperatura ultrabaixa (-196 °C), paralisa todas as atividades, como divisão celular e reações metabólicas, permitindo o armazenamento do material vegetal por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2004).

Dentre as técnicas empregadas, a dessecação e a vitrificação em gotas, têm sido aplicadas com sucesso em diversas espécies, com resultados promissores para o coqueiro e mangabeira (ENGELMANN, 2011; VIEIRA, 2000; SANTOS, 2001). Entretanto, resultados com o coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui são inexistentes e com embriões zigóticos de mangabeira são ineficientes.

O objetivo do trabalho foi avaliar técnicas de criopreservação por dessecação e vitrificação em gotas em coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui e mangabeira nativa do Nordeste.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é também conhecido como "árvore da vida" porque cada componente pode ser utilizado para consumo *in natura* ou transformado pela indústria. É uma planta tropical que apresenta uma ampla gama de produtos e subprodutos para a utilização na alimentação humana, indústria da construção civil, cosmética e na produção de biodiesel. Por ser adaptado a solos de baixa fertilidade natural, é cultivado em mais de 86 países. O fruto é constituído por albúmen líquido (água de coco), albúmen sólido ou amêndoa, endocarpo conhecido popularmente como -quengall e casca. A casca representa em torno de 57% do fruto sendo composta pelo mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo (camada mais externa da casca). O volume e o peso da casca variam de acordo com as condições e a forma climática da região de plantio, adubação, os tratos culturais e fitossanitários do coqueiro, além da variedade cultivada (SIQUEIRA et al., 2002).

Em 2017, a cocoicultura foi expressiva na economia do Nordeste brasileiro, região responsável pela maior parte da produção (71,36%), com a produção de 684.501.049 mil frutos. Os maiores produtores dessa região são os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Sergipe. A região Norte com 13,54% e Sudeste com 14,20% da produção, também contribuem para o abastecimento nacional (IBGE, 2017). A sua importância na grande maioria dos países se deve ao seu papel na produção de óleo e como cultura de subsistência para os pequenos agricultores, fornecendo alimentos, bebidas, combustíveis, ração para animais e abrigo. Da casca se extrai a fibra, que é empregada em estofamentos de veículos, enchimento de colchões, tapeçaria, cordoaria e fábrica de pincéis. Além de sua importância econômica, a espécie tem um papel muito importante na sustentabilidade de ecossistemas frágeis, a exemplo das comunidades costeiras (SIQUEIRA et al., 2002).

O coqueiro é constituído pela espécie *Cocos nucifera* L. e duas variedades principais, sendo a variedade Gigante (Típica) e a variedade Anã (Nana). A variedade gigante, que compõe 70% dos coqueirais brasileiros, apresenta crescimento rápido e sua fase vegetativa é longa, iniciando seu florescimento entre 5 e 7 anos quando cultivado em condições edafoclimáticas ideais. Essa variedade atinge normalmente de 20 a 30 m de altura, podendo produzir até 80 frutos/planta/ano, de tamanho que varia de médio a grande, e com vida econômica de 60 a 70 anos (RIBEIRO et al., 2002).

Já a variedade Anã, que compõe 20% dos coqueirais brasileiros, cresce cerca de 10 m, é uma planta suscetível a pragas, sofre com a falta de água, mas seu fruto é grande, tem maior quantidade de polpa e água. Sua produtividade econômica é de 40 anos, produzindo 100 a 120 frutos ao ano, sua fecundação é por autopolinização. Em geral apresenta maiores exigências de clima e solo que a variedade Gigante (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

Além das variedades Gigante e Anã, existem os ecotipos vermelho e amarelo, como também os cruzamentos realizados entre anões e gigantes, denominados híbridos. Para obtenção de híbridos por meio do melhoramento genético, é importante a manutenção do germoplasma do coqueiro para pesquisas e avaliação destes materiais genéticos (SILVA, 2016).

2.2 Aspectos gerais da mangabeira

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Brasil, pertencente à família Apocynaceae que apresenta importância social, econômica e cultural. Essa espécie está distribuída nas regiões Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste e vem destacando-se pelas diversas possibilidades de aproveitamento de seus frutos que podem ser consumidos maduros, *in natura* e industrializados (LÉDO et al., 2015; GANGA et al., 2010; SOARES et al., 2011).

A mangabeira produz frutos de sabor singular que podem ser utilizados na agroindústria como também na fabricação caseira de polpas, sucos e sorvetes, possuem alto valor nutricional, sendo ricos em provitamina A, vitaminas B1, B2 e C, além de ferro, fósforo e zinco. Há grande potencial para industrialização devido à presença de taninos, compostos fenólicos e pigmentos naturais, o que confere à mangabeira um sabor exótico e aroma peculiar (SILVA JUNIOR et al., 2011; FREITAS, 2012).

As características predominantes se referem aos frutos tipo baga, de variados tamanhos, geralmente elipsoidais ou arredondados, variando de 2,5 a 6,0 cm de diâmetro, exocarpo amarelado ou esverdeado com pigmentação vermelha ou sem pigmentação, polpa amarela, bastante suave e carnosos-viscosa (GANGA, et al., 2009; VENTURINI FILHO, 2010).

Algumas partes da planta têm aplicação na medicina popular, como a casca, com propriedades adstringentes, que produz diferentes tipos de flavonoides, catequinas, antocianinas e taninos usados no tratamento de gastrite. O látex pode ser empregado contra pancadas, inflamações, diarreia, tuberculose, úlceras e herpes, e possui propriedade angiogênica e com menor potencial alergênico comparado ao látex de seringueira. O chá da folha é usado para cólica menstrual (SILVA JUNIOR, 2004; MALMONGE et al., 2009; MORAES et al., 2008).

A ocorrência natural da mangabeira favorece sua exploração extrativista, sendo a colheita dos frutos praticada pelas populações locais de forma sustentável (YOKOMIZO et al., 2017). Como a demanda por frutos de mangabeira é alta e sua produção depende do extrativismo, isso se torna um fator limitante para atender à indústria de processamento de frutos. Essa característica de produção também confere à mangabeira, além da importância econômica, um papel social para as famílias que dependem desse tipo de atividade, na qual a extração de frutos permite contribuir para a segurança alimentar, e também funciona como uma fonte de renda necessária para essas famílias (BESSA et al., 2012; SOARES et al., 2015).

A atividade extrativista também proporciona um impacto sobre as populações naturais dessa espécie. Esse impacto é considerado mais intenso nas regiões dos Tabuleiros Costeiros e nas baixadas litorâneas, onde a extração para fins comerciais ocorre de maneira intensiva. Além disso, o crescente desmatamento vem contribuindo para que essa espécie nativa perca sua diversidade genética, principalmente, à grande redução na área original dos ecossistemas pela especulação imobiliária e intensificação da atividade agrícola (VIDAL, 2010; SILVA et al., 2011).

Nesse contexto, a mangabeira insere-se como uma espécie que está em processo de erosão genética, sendo necessário buscar iniciativas para manter a diversidade genética de suas populações naturais. Assim, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estratégias de conservação do germoplasma (SÁ et al., 2011; LÉDO et al., 2015).

Além do processo de erosão genética, a mangabeira apresenta sementes recalcitrantes, o que dificulta sua conservação em bancos de sementes, pois as mesmas perdem rapidamente o seu poder germinativo assim que são retiradas dos frutos. Dessa forma, seu armazenamento ocorre apenas por curtos períodos, pois não tolera a desidratação necessária para que ocorra o armazenamento em baixas temperaturas, o que inviabiliza a sua conservação por longos períodos de tempo (SOARES et al., 2007; ENGELMANN, 2011).

2.3 Conservação de recursos genéticos

O Brasil é considerado um dos países com maior diversidade biológica no mundo, com uma extensa superfície de terras e grande parte delas apropriadas para o cultivo, tendo à disposição, recursos hídricos abundantes e um clima tropical e subtropical favoráveis. Entretanto, em função da crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e da sensível erosão genética em muitas espécies de plantas com potencial alimentício, torna-se evidente a

necessidade do desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de conservação de germoplasma (RYLANDS; BRANDON, 2005; SÁ et al., 2011).

Os recursos genéticos provenientes de diversas espécies frutíferas podem ser considerados a base da subsistência da humanidade, sendo utilizados há milênios tanto na alimentação *in natura*, como também pelo uso e consumo de seus subprodutos. Esses recursos permitem suprir necessidades básicas e ajudam a resolver problemas como a fome e a pobreza. Dada a sua importância, essa característica confere ao país uma maior responsabilidade global em proteger e conservar os seus recursos genéticos para benefícios das gerações presentes e de forma que ele esteja disponível para utilização futura (JARAMILLO; BAENA, 2000).

A variabilidade genética presente em uma espécie, essencial para sobrevivência e adaptação a possíveis mudanças do ambiente, é a base para programas de conservação genética. A compreensão dos padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação intraespecífico são de fundamental importância para a definição de estratégias de conservação e uso sustentado desses recursos genéticos. Nesse contexto, a diversidade genética é importante para garantir o potencial adaptativo das espécies frente às adversidades ambientais. A quantificação dessa variabilidade dentro das populações é necessária para avaliar como as espécies enfrentam o ambiente, sua sobrevivência e formas de reprodução ao longo dos tempos. A análise da variabilidade genética das espécies tem papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo (GRIBEL, 2001; RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Assim, inserem-se as formas de conservação de recursos genéticos, onde eles podem ser conservados nos seus habitats naturais (*in situ*), em condições diferentes às do seu habitat natural (*ex situ*), ou combinando os métodos de maneira complementar. A definição de conservação *in situ* baseia-se na conservação genética que ocorre em reservas, onde o manejo e o monitoramento dos recursos genéticos de populações silvestres se encontram dentro de áreas definidas para conservação ativa, em longo prazo, como também na conservação *on farm* que corresponde ao cultivo e manejo contínuo de populações de plantas no sistema tradicional realizado por comunidades locais e povos indígenas (CLEMENT et al., 2007).

A conservação *in situ* permite a preservação da continuidade do processo evolutivo das espécies nas condições do seu habitat natural. Apesar de ser uma alternativa para muitas espécies, ainda é muito pouco utilizada em razão basicamente dos problemas de ordem fundiária e das dificuldades de manejo do germoplasma envolvido (COSTA et al., 2012).

Já o modelo de conservação *ex situ* refere-se ao conjunto de técnicas que visam impedir a perda de diversidade genética e reverter o quadro de extinção, resgatando, conservando e disponibilizando germoplasma para ações de recuperação de habitats e de reintrodução de espécies. Esse modelo de conservação é fundamental nas situações em que a extinção é provável ou iminente e em apoio a outras ações que promovem a conservação *in situ* das espécies. O sucesso dessa técnica depende de espaços e estruturas físicas adequadas, conhecimentos e técnicas específicos e da cooperação de diversos agentes (COSTA et al., 2016).

A seleção de um ou vários métodos depende das necessidades, possibilidades e da espécie em foco. Um banco de germoplasma consiste numa base física, seja em centros de pesquisa ou instituições públicas e privadas, que conservam as coleções sob a forma de sementes, explantes *in vitro* ou plantas a campo. Adicionalmente, é definido como sendo o repositório onde se armazena a variabilidade genética de uma ou de várias espécies. A conservação de germoplasma de espécies frutíferas é quase que exclusivamente realizada a campo, com poucas duplicatas de acessos de algumas espécies na forma de sementes ortodoxas e/ou cultura de meristema *in vitro* (JARAMILLO; BAENA, 2000; FERREIRA, 2011).

Na estratégia de conservação *ex situ* são adotadas diferentes técnicas: câmaras de conservação de sementes em temperaturas negativas (de -18 a -20 °C); cultura de tecidos de

plantas (conservação por crescimento lento); criopreservação (de -156 °C a -196 °C); além de Bancos Ativos de Germoplasma, em campo (SANTOS; SALOMÃO, 2010).

De acordo com Roberts (1973), as sementes são classificadas em dois grupos distintos com relação ao comportamento no armazenamento. No primeiro estão as sementes ortodoxas, que apresentam alta longevidade e se mantêm viáveis após dessecação, até um grau de umidade em torno de 5%, podendo ser armazenadas sob baixas temperaturas por longos períodos. No segundo grupo têm-se as recalcitrantes, ou sementes sensíveis à dessecação, que possuem viabilidade reduzida em função do tempo por não tolerarem a desidratação e não sobreviverem com baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento em longo prazo (VILLELA; PERES, 2004; CARVALHO et al., 2006).

Além desses grupos há um terceiro, onde estão as sementes intermediárias, as quais possuem atributos em diferentes níveis das citadas anteriormente. Esse grupo é composto por espécies cujas sementes não toleram a dessecação a níveis extremamente reduzidos, suportando a dessecação entre 7% e 10% de teor de água, podendo ser armazenadas por até dois meses sem comprometer a viabilidade e vigor (FERREIRA, 2011; MARCOS FILHO, 2015).

A manutenção das espécies fora de seu habitat natural tem como principais características preservar alelos por séculos; permitir que em apenas um local seja reunido material genético de muitas procedências, facilitando o trabalho do melhoramento genético; garantir melhor proteção à diversidade intraespecífica, especialmente de espécies de ampla distribuição geográfica. Esse método implica, entretanto, na paralisação dos processos evolutivos, além de depender de ações permanentes do homem, visto concentrar grandes quantidades de material genético em um mesmo local, o que torna a coleção bastante vulnerável (MAPA, 2017).

Uma das estratégias mais utilizadas para conservação de recursos genéticos é a formação de Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs). Entretanto, os BAGs estão suscetíveis a desastres naturais, ataques de patógenos e microrganismos. Outras limitações dos bancos em campo estão relacionadas à necessidade de grandes áreas e o alto custo de manutenção (DULLOO et al., 2009; RAI et al., 2009).

As fontes de variabilidade genética disponíveis nas coleções de fruteiras tropicais, no Brasil, são limitadas e estão sujeitas à erosão genética, com eventuais perdas de germoplasma (LUNA; RAMOS JUNIOR, 2005). A vulnerabilidade das plantas, as intempéries climáticas e os ataques de patógenos em condições de campo têm dificultado a conservação dos recursos genéticos *in situ* (NOGUEIRA, 2010).

Como alternativa complementar a essa problemática, inserem-se as técnicas de conservação *in vitro* que são métodos promissores para a manutenção de recursos genéticos vegetais (HARDING et al., 1997). Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* para conservação em bancos de germoplasma foram amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de mil espécies, muitas das quais oriundas de regiões tropicais. Para as espécies ameaçadas de extinção e cuja conservação por sementes não é possível, esse é um método considerado altamente promissor (HOYT, 1992).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas para a conservação *in vitro* é estratégia complementar à conservação da variabilidade genética existente e permite acelerar a multiplicação de genótipos promissores (PILATTI et al., 2011). A partir desses trabalhos é possível conhecer os subsídios relevantes para programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos dessa frutífera (LÉDO et al., 2007).

2.4 Conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas tropicais

Com sua ampla diversidade, o Brasil apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo de diversas espécies frutíferas de origem tropical e exóticas, com uma produção de 4,816 milhões de toneladas e R\$ 12,894 bilhões em 2017. Ocupa a terceira posição mundial

perdendo apenas para China e Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018).

Diante disso, para dar suporte a programas de melhoramento genético e conservação de recursos genéticos, a Embrapa e outras instituições mantêm Bancos Ativos Germoplasma (BAGs) e coleções de espécies frutíferas. São em torno de 212 gêneros, 668 espécies e mais de 107 mil acessos distribuídos em 350 Bancos Ativos de Germoplasma (MARIANTE et al., 2008).

Em Sergipe, a Embrapa Tabuleiros Costeiros vem intensificando ações de coleta, caracterização e conservação de germoplasma de coqueiro e mangabeira. O Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG Coco) da Embrapa Tabuleiros Costeiros iniciou as suas ações em 1982, quando foram importados da Costa do Marfim os primeiros acessos. O BAG Coco está vinculado à Plataforma de Recursos Genéticos da Embrapa, e em 2006, a partir de um Memorando de Entendimento (MOA) entre a Embrapa e o *Bioversity International*, foi estabelecido sob a coordenação da Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT), o Banco Internacional de Germoplasma de Coco para América Latina e Caribe (ICG-LAC).

O BAG Coco mantém a variabilidade genética por meio da conservação de 35 acessos de coqueiro Anão e Gigante. Atualmente, os acessos estão implantados em dois campos experimentais: no Campo Experimental de Itaporanga, localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe; o segundo, em fase de desativação, encontra-se localizado no antigo Campo Experimental do Betume, no município de Ilha das Flores, Sergipe. O BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros é classificado como o Banco Internacional de Germoplasma de Coco da América Latina e Caribe com conservação *ex situ* e *in vitro* de um total de 27 acessos de coqueiro (RAMOS et al., 2008).

A conservação do germoplasma dessa espécie é considerada de importância mundial e resultou no Tratado Internacional sobre Recursos Genéticos para Alimentação e Agricultura, organizado pela FAO, com 146 países signatários, incluindo o Brasil (FAO, 2009). No Brasil existem três coleções de germoplasma de coqueiro, localizadas na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EDBA), Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) e Embrapa Tabuleiros Costeiros.

O Banco Ativo de Mangabeira (BAG Mangaba), iniciado em 2006, localiza-se no Campo Experimental de Itaporanga d'Ajuda, no município de Itaporanga d'Ajuda, distante 28 km de Aracaju, Sergipe e pertencente à Embrapa Tabuleiros Costeiros. Implantado em área de restinga, atualmente possui 299 indivíduos, que representam 27 acessos (OLIVEIRA, 2018). A propagação dos acessos foi realizada por sementes de polinização aberta, de matrizes coletadas em populações naturais nos estados da Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco, Alagoas, Ceará, Pará e Minas Gerais.

Os acessos estão plantados com espaçamento de 6 metros entre plantas e 7 metros entre acessos, nominados de acordo com a localidade na qual as amostras foram coletadas. O banco foi criado com o intuito de realizar pesquisas que visam à prospecção, coleta, caracterização, conservação *ex situ* e utilização de uma ampla variabilidade dos recursos genéticos da mangabeira de ocorrência nos ecossistemas de Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea do Nordeste e em áreas adjacentes (SILVA JÚNIOR; LÉDO, 2006).

Os BAGs Coco e Mangaba estão em contínuo enriquecimento com coletas e recebimento de acessos de diferentes regiões do Brasil, com intercâmbio com outros bancos e coleções.

2.5 Aplicação da criopreservação na conservação em longo prazo de espécies frutíferas

Técnicas baseadas na criopreservação têm sido utilizadas para a conservação do material vegetal *in vitro*. A técnica de criopreservação consiste na conservação de material em nitrogênio líquido a -196 °C. O procedimento de conservação por crescimento lento visa reduzir o metabolismo da planta por meio da manipulação do ambiente e das condições de

cultivo, onde o armazenamento do material ocorre somente em curtos ou médios prazos (ENGELMANN, 2011; REED et al., 2011). Cada método de conservação possui vantagens e desvantagens, assim necessitando de estratégias complementares para uma conservação máxima da diversidade genética, variando de acordo com cada espécie (MARTIN; PRADEEP, 2003).

Dessa forma, a criopreservação se apresenta como uma alternativa complementar segura, por possibilitar a exposição às temperaturas negativas, o que paralisa as atividades do material vegetal, como divisão celular e reações metabólicas, permitindo o armazenamento por períodos indeterminados. Além disso, as coleções provenientes desse tipo de técnica são mantidas em pequenos espaços, permanecendo protegidas de contaminação com pequena manutenção (ENGELMANN, 2004; BENSON, 2008; SARTOR et al., 2012; CHEN et al., 2011).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a criopreservação, sendo sua aplicação dependente da espécie e do explante a ser criopreservado (PANIS; LAMBARDI, 2005). Diferentes tipos de propágulos podem ser criopreservados, como ápices caulinares, pólen, sementes, gemas laterais, embriões somáticos e zigóticos, calos ou cultura de células em suspensão (REED, 2011). Os métodos de criopreservação podem ser desdobrados em etapas conhecidas como: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, descongelamento e recuperação do crescimento (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

A maioria das células vivas vegetais possui grande quantidade de água, considerando esse fator, o sucesso da técnica de criopreservação depende diretamente do impedimento do congelamento do conteúdo intracelular e indução da sua vitrificação antes do resfriamento em nitrogênio líquido. Os cristais de gelo promovem a ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentalização da célula, ocasionando, conseqüentemente, a morte celular (SANTOS, 2000; KAMI, 2012). Extensiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado; assim, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo (SANTOS, 2001; SANTOS; SALOMÃO, 2010).

Entre as principais técnicas de criopreservação estão o resfriamento lento, caracterizado pelo uso de baixas concentrações de crioprotetores e redução gradual da temperatura (KARTHA; ENGELMANN, 1994). A técnica de vitrificação pode ser definida como a transição direta da água no estado líquido para um estado amorfo ou vítreo, esse processo ocorre por meio da desidratação dos tecidos para obtenção de um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização antes de mergulhar o explante em nitrogênio líquido. A desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com uma solução altamente concentrada de crioprotetores químicos (solução de vitrificação) como também o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, dentre outros. (ENGELMANN, 2011; VIEIRA, 2000; SANTOS, 2001).

Uma das técnicas desenvolvidas recentemente é a *droplet vitrification*, uma adaptação do método de vitrificação que consiste no pré-tratamento dos explantes com solução de vitrificação antes que sejam dispostos em tiras de papel alumínio com uma gota de *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) ou *Plant Vitrification Solution 3* (PVS3) e então imersos em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011).

A tecnologia de encapsulamento, também empregada com sementes sintéticas, desenvolvida por Kitto e Janick (1982), baseia-se no uso de embriões somáticos como sementes funcionais. Consiste no envolvimento do material vegetal, como ápices caulinares ou gemas laterais, em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio (BENELLI et al., 2013).

A técnica de encapsulamento-desidratação também utiliza explantes que são encapsulados em matriz de alginato e cloreto de cálcio, sendo pré-cultivados em meio contendo altas concentrações de sacarose e submetidos à dessecação em fluxo laminar ou sílica gel e, reduzindo o teor de água de 20 a 30%, onde após essas etapas, são imersos em

nitrogênio líquido. Esses procedimentos permitem taxas de resfriamento ultrarrápidas, diminuindo a formação de cristais de gelo, prejudiciais às células (FABRE; DEREUDDRE, 1990; FULLER, 2004).

Inclui-se também o encapsulamento-vitrificação que é uma combinação das duas técnicas. Nesse processo, explantes pré-cultivados em sacarose são encapsulados em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio, formando as cápsulas. Em seguida, essas são expostas ao PVS2 ou PVS3, sem desidratação física prévia e imersas no nitrogênio líquido. Esse tipo de protocolo também pode incluir o uso de soluções de carregamento e descarregamento, e o descongelamento em banho-maria, como no procedimento da vitrificação (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI et al., 2008).

Diversos estudos têm sido realizados para obtenção de protocolos de criopreservação em espécies frutíferas como cacau (FANG et al., 2008), mamão (KAITY et al., 2008), citrus (KAYA et al., 2017), kiwi (BACHIRI et al., 2001; WU et al., 2001; ZHAI et al., 2003; XU et al., 2006), caqui (AI; LUO, 2003; NIU et al., 2012), uva (HAO et al., 2005; WANG et al., 2000; MATSUMOTO; SAKAI, 2003; ZHAO et al., 2001; ZHAI et al., 2003), coco (CUETO et al., 2014; KARUN et al., 2014; NOVARIANTO et al., 2014; NGUYEN et al., 2015; WELEWANNI et al., 2017), manga (WU et al., 2007), maracujazeiro (MERTHY et al., 2014), entre outras.

No Brasil, a criopreservação tem sido utilizada na conservação de recursos genéticos de muitas espécies, incluindo aquelas ameaçadas de extinção e com características recalcitrantes e intermediárias. Alguns estudos já foram realizados em abacaxizeiro (SOUZA et al., 2016), jenipapeiro (SANTOS; SALOMÃO, 2016), mangabeira (NOGUEIRA, 2010; SARTOR, 2012; SANTOS et al., 2015; PRUDENTE et al., 2017) e murici (SILVA et al., 2013). Souza et al. (2016) também reforçaram a eficiência da técnica de vitrificação em gotas com diferentes genótipos de abacaxi (*Ananas comosus*), expostos ao PVS2 em diferentes tempos (30; 45; 60 e 90 minutos) com média e altas taxas de regeneração (100; 100; 93 e 40%, respectivamente). Sá et al. (2015) observaram altas taxas de regeneração de ápices caulinares encapsulados de jenipapeiro, imersos em soluções crioprotetoras (0,5 M de sacarose) e desidratados em câmara de fluxo laminar por 0, 2 e 4 horas atingindo 91; 67; 100 e 91,67% de regeneração. Entretanto, a regeneração não foi observada após a criopreservação. Estudos realizados por Santos e Salomão (2016) constataram alta porcentagem de regeneração de eixos embrionários de jenipapeiro criopreservados (93; 96 e 93%, em sementes com 13,26; 9,57 e 6,79% de umidade, respectivamente).

Os primeiros estudos de criopreservação com coco foram realizados por Assy-Bah e Engelmann (1992), por meio da técnica de vitrificação em embriões zigóticos maduros do coco PB 121 híbrido (anão amarelo da Malásia x gigante Africano), o anão vermelho dos Camarões, gigante Indian e gigante de Rennel. Estudos mais recentes indicam a viabilidade de técnicas de criopreservação usando embrião zigótico, plúmulas e pólen como explantes (KARUN; SAJINI, 2010; SAJINI et al., 2011; CUETO et al., 2014; WELEWANNI et al., 2017).

Entretanto, poucos estudos são relatados para a criopreservação de acessos de coqueiro cultivados no Brasil, como o coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) e o coqueiro gigante do Brasil da Praia do Forte. Pesquisas preliminares foram publicadas para avaliação da viabilidade de embriões zigóticos de AVeBrJ criopreservados, por meio de testes de condutividade eletrolítica e lixiviação de potássio (COPELAND-GOMES et al., 2012, 2015), porém, sem regeneração após a criopreservação.

Recentemente, resultados promissores foram publicados por Léo et al. (2018), com o estabelecimento de protocolo de criopreservação de embriões zigóticos de AVeBrJ por vitrificação. Apesar disso, para outros genótipos, são necessários ajustes de protocolos de acordo com genótipos e tipos explantes. A técnica de vitrificação é baseada em explantes expostos a soluções de vitrificação à base de glicerol como PVS3 (NISHIZAWA et al., 1993).

Essa técnica foi aplicada para o coco com variação de respostas em coqueiro gigante da Costa Oeste (SAJINI et al., 2011) e coqueiro anão amarelo da Malásia (CUETO et al., 2014).

Na literatura são reportados resultados promissores de criopreservação em mangabeira (NOGUEIRA, 2010; SARTOR et al., 2012; PRUDENTE et al., 2014; SANTOS et al., 2015). Santos et al. (2015) relataram a eficiência das técnicas de vitrificação em gotas e vitrificação com mais de 70% de regeneração de ápices caulinares de mangabeira na fase de crioproteção com PVS2 e após a criopreservação. Em estudos com genótipo de mangabeira oriundo de Pirambu-SE, Santos et al. (2015) aplicando a técnica de droplet-vitrificação com solução PVS₂, obtiveram 90% de retomada de crescimento de ápices caulinares. Prudente et al. (2014), com as técnicas de encapsulamento-vitrificação e droplet-vitrificação de gemas laterais, alcançaram 89 e 84% de regeneração, respectivamente. Entretanto, a não regeneração de gemas laterais *Hancornia speciosa* Gomes encapsuladas foi observada por Sartor et al. (2012) e Nogueira (2010) com tratamento crioprotetor de dimetilsulfóxido (DMSO) combinado com sacarose.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, P.; LUO, Z. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 36, p. 553-556, 2003.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2018. Editora Gazeta: Santa Cruz do Sul: 2018. 88 p.

ASSY BAH, B.; ENGELMANN, Florent. Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, v. 13, p. 67-74, 1992.

BACHIRI, Y.; SONG, G.Q.; PLESSIS, P.; SHOAR-GHAFFARI, A.; REKAB, T.; MORISSET, C. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp.) germplasm by encapsulation–dehydration: importance of plant growth regulators. **CryoLetters**, v. 22, p. 61-74, 2001.

BENELLI, C.; CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, v. 31, p.171-185, 2013.

BENSON, E.E. Cryopreservation theory. In: REED, B.M. (Ed.) **Plant cryopreservation- a practical guide**. New York: Springer, p.15-32, 2008.

BESSA, L.A.; SILVA, F.G.; MOREIRA, M.A.; TEODORO, J.P.R.; SOARES, F.A.L. Characterization of the effects of macronutrient deficiencies in mangabeira seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1235-1244, 2012.

CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

CHEN, X. L.; LI, J. H.; XIN, X.; ZHANG, Z. E.; XIN, P. P.; LU, X.X. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

CLEMENT, C. R.; ROCHA, S. F. R.; COLE, D. M.; VIVAN, J. L. Conservação on farm. In: NASS, L. (ed.) **Conservação de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

COPELAND-GOMES, K.K.P.; LEDO, A. da S.; ALMEIDA, F.T.C.; MIRANDA, R.P.; SANTOS, I.R.I. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 8-13, 2012.

COPELAND-GOMES, K.K.P.; SANTOS, I.R.I.; ALMEIDA, F.T.C.; LEDO, A. da S. Performance of cryoprotectants, dehydration methods and tetrazolium test on the zygotic embryos of BGD coconut. **Scientia Plena**, v. 11, p. 1-7, 2015.

COSTA, A.M.; SPEHAR, C.R.; SERENO, J.R.B. (Org.). **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2012.

COSTA, M.L.M.; BAJGIELMAN, T.; PEREIRA, T.S.; MAURENZA, D.; AMARO, R.; DALCIN, E.C.; MAUNDER, M. **Estratégia Nacional para a conservação ex situ de espécies ameaçadas da flora brasileira**. Centro Nacional de Conservação da Flora — CNC Flora: Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro. 24 p, 2016.

CUETO, C.; RIVERA, R.L.; KIM, H.H.; KONG, H.J.; BAEK, H.J.; SEBASTIAN, L.; PARK, J. Development of cryopreservation protocols for cryobanks of coconut zygotic embryos. **Acta Horticulture**, v. 1039, p. 297-300, 2014. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1039.37.

DULLOO, M.E.; EBERT, A.W.; DUSSERT, S.; GOTOR, E.; ASTORGA, C.; VASQUEZ, N.; SNOOK, L. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.

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

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

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. **Cryo Letters**, n. 11, p. 413-426, 1990.

FANG, J.; WETTEN, A.; JOHNSTON, J. Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 453-461, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **International treaty on plant genetic resources for food and agriculture**. Rome: FAO, 2009.

FERREIRA, F. R. Germplasm of fruit crops. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 1-6, 2011.

FREITAS, A. C. de. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes): Localização de populações nativas no cerrado amapaense e caracterização morfológica das progênes do banco ativo de germoplasma**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente, Cultura e Desenvolvimento Regional) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2012.

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

GANGA, R.M.D.; CHAVES, L.J.; NAVES, R.V. Parâmetros genéticos em progênes de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Scientia Forestalis**, v. 37, p. 395-404, 2009.

GANGA, R.M.; FERREIRA, G.A.; CHAVES, L.J.; NAVES, V.R.; NASCIMENTO, J.L. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 101-113, 2010.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, n. 48, p.110-114, 2001.

HAO, Y.; CHENG, Y.; DENG, X. Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from in vitro conservation. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 2 p. 237-243, 2005.

HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K. **Plant conservation biotechnology: an overview**. Agro-Food-Industry Hi-Tech, 1997.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres de plantas cultivadas**. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, p. 52, 1992.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. 2017. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?loalidade=0&tema=76278 Acesso em: 27 de julho de 2018.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. 2000, 207 p.

KAITY, A.; ASHMORE, S. E.; DREW, R.A.; DULLOO, M.E. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1529-1539, 2008.

KAMI, D. Cryopreservation of plant genetic resources. In: KATKOV, I. (Ed). **Current frontiers in cryobiology**. In Tech., p.439-456, 2012.

KAYA, E.; SOUZA, F.; GÖKDOĞAN, E.Y.; CEYLAN, M.; JENDEREK, M. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, n. 1, p. 242-248, 2017.

KARTHA, K.K.; ENGELMANN, F. Cryopreservation and germplasm storage. In: **Plant cell and tissue culture**. Springer Netherlands, p: 195-230, 1994.

KARUN, A.; SAJINI, K.K. **Cryopreservation f coconut zygotic embryos and pollen**. Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute, 18p. 2010. (Technical Bulletin, 63)

KARUN, A., SAJINI, K.K., NIRAL, V., AMARNATH, C.H., REMYA, P., RAJESH, M.K., ENGELMANN, F. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 35, n. 5, p. 407-417, 2014.

KITTO, S.K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488, 1982.

LOBO, F.A.; CAMPELO JUNIOR, J.H.; RODRIGUEZ-ORTÍZ, C.E.; LUCENA, I.C.; VOURLITIS, G.L. Leaf and fruiting phenology and gas exchange of Mangabeira in response to irrigation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 1-10, 2008.
LÉDO, A. da S.; VIEIRA NETO, R.D.; SILVA JUNIOR, J.F.da; SILVA, A.V.C. da; PEREIRA, AV. **A cultura da mangaba**. Brasília: Embrapa, 2015.

- LUNA, J.V.U.; RAMOS JUNIOR, D.S. Banco de germoplasma de fruteiras nativas. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 1, p. 25-28, 2005.
- LÉDO, A.da S.; SECA, G.S.V.; BARBOZA, S.B.S.C.; SILVA JUNIOR, J.F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.
- LÉDO, A. da S.; JENDEREK, M.; SKOGERBOE, D.; STAATS, E.; MACHADO, C.A.; OLIVEIRA, L.A.R. Cryopreservation of zygotic embryos of Brazilian Green Dwarf Coconut. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 514-517, 2018.
- MALMONGE, J.A.; CAMILLO, E.C.; MORENO, R.M.B.; MATTOSO, L.H.C.; MCMAHAN, C.M. Comparative study on technological properties of látex and natural rubber from *Harconia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p. 2986 -2991, 2009.
- MAPA – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>. Acesso em: 12 março de 2018.
- MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. Estado da diversidade. In: MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. **Informe Nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para a alimentação e agricultura do Brasil**. Brasília: MMA; MAPA, 2008. 113p;
- MARTIN, K.P.; PRADEEP, A.K. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 197-200, 2003.
- MARTINS, C.R.; JESUS JUNIOR. L.A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panomara 2010**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28p. Documentos 164.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660p.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A. Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. **Euphytica**, v. 131, n. 3 p. 299–304, 2003.
- MERTHY, T.S.M.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants. **Cryo Letters**, v. 35, n. 3, p. 204-215, 2014.
- MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T.M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 161-168, 2008.
- NGUYEN, Q.T.; BANDUPRIYA, H.D.; LÓPEZ-VILLALOBOS, A.; SISUNANDAR, S.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1059-1076, 2015.

NIU, Y.; LUO Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of *Diospyros kaki* Thunb. using different methods. **Cryo Letters**, v. 33, n. 1 p. 69-74, 2012.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by the vitrification method. **Plant Science**, v. 88, p. 67-73, 1993. DOI: 10.1016/0168-9452(93)90189-7.

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

NOVARIANTO, H., MASHUD, N., SAMOSIR, Y.M.; ADKINS, S. W. Embryo maturity plays an important role for the successful cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 6, p. 688-695, 2014.

N'NAN, O.; HOCHER V.; VERDEIL, J-L.; KONAN, J.L.; BALO, K.; MONDEIL, F.; MALAURIE, B. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryo Letters**, v. 29, n. 4, p. 339-350, 2008.

OLIVEIRA, J.M.S.P. **Conservação ex situ de *Hancornia speciosa* Gomes: o banco ativo de germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros**. 2018. 46p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2018.

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.

PILATTI, F.K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E.E.; VIANA, A.M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v. 47, p. 82-98, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-010-9302-y>>. Acesso em: 2 de fevereiro 2018.

PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R.; NERY, F.C.; PAIVA, P.D. de O.; REIS, M. V. dos; SILVA, L.C. Criopreservação de gemas laterais de mangabeira: o papel da prolina. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 86-93, 2014.

PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R.; NERYF, C.; REIS, M.V.; PAIVA, P.D. de O.; SILVA, L.C. Encapsulation of lateral buds of *Hancornia speciosa*. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 59-64, 2017.

PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R. Plant Cryopreservation: biochemical aspects. **Journal of Cell and Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2017.

RAI, M.K.; ASTHANA, P.; SINGH, S.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants—a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 671-679, 2009.

RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A. de; ROMÃO, R.L.; SILVA JUNIOR, J.F. da. Germoplasma vegetal conservado no Nordeste brasileiro: Situação atual, prioridades e perspectivas. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 205-2017, 2008.

- REED, B.M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2011.
- RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. ***Revista de Ciências Médicas e Biológicas***, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.
- RIBEIRO, F.E.; SIQUEIRA, E.R. de; ARAGÃO, W.M. Coqueiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.) ***Melhoramento de Fruteiras Tropicais***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 225-249, 2002.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. ***Seed Science and Technology***, v. 1, n. 4, p. 499-514, 1973.
- RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. Unidades de conservação brasileiras. ***Megadiversidade***, v. 1, n. 1, p.28-35, 2005.
- SAJINI, K.K.; KARUN, A.; ARMARNATH, C.H.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. ***Cryo Letters***, v. 32, n. 4, p. 317-328, 2011.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. ***Cryo Letters***, v. 28, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. et al. (Ed.). ***Plant cryopreservation: a practical guide***. New York: Springer, p. 33-58, 2008.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. ***Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal***, v. 12, p.70-84, 2000.
- SANTOS, R.O.S. ***Caracterização de jenipapeiros (Genipa americana L.) em Cruz das Almas-BA***. 2001. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, 2001.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. ***Manual de curadores de germoplasma – vegetal: criopreservação***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16p. 2010.
- SANTOS, P.A.A.; PAIVA, R.; SILVA, L.C.; SOUZA, A.C.; SANTANA, M.C.; SILVA, D.P.C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for longterm storage. ***Acta Scientiarum. Agronomy***, v. 37, p. 289-296, 2015.
- SANTOS, C.Z.A.; FERREIRA, R.A.; SANTOS, L.R.; SANTOS, L.I.; GOMES, S.H.; GRAÇA, D.A.S. Análise qualitativa da arborização urbana de 25 vias públicas da cidade de Aracaju – SE. ***Ciência Florestal***, v. 25, n. 3, p. 751-763, 2015.
- SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N. Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using in vitro culture. ***International Journal of Agronomy***, v. 2016, p. 1-6, 2016.
- SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. ***Revista Agrotecnologia***, v. 3, n. 1, p.31-39, 2012.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C.A. da S. In vitro conservation of mangaba tree in Northeast Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SÁ, F.P.; SOUZA, V.F.D.; SILVA, V.C.; LÉDO, S.A. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.

SILVA, L.C.; PAIVA, R.; SWENNEN, R.; ANDRÉ, E.; PANIS, B. Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: a woody tropical and medicinal plant species from Brazilian cerrado. **Cryo Letters**, v. 34, n. 4, p. 338-348, 2013.

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

SILVA JUNIOR, J.F. da; LÉDO, A. da S. (Ed.). Botânica. In: SILVA JUNIOR, J.F. da; LÉDO, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 25-33.

SILVA, A.V.C.; DOS SANTOS, A.R.; WICKERT, E.; DA SILVA JÚNIOR, J.F.; COSTA, T.S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, p. 572-578, 2011.

SILVA JÚNIOR, J.F. da; MOTA, D.M.; SCHMITZ, H. No rastro da mangabeira. In: MOTA, D.M.; SILVA JÚNIOR, J.F. da; SCHMITZ, H.; RODRIGUES, R.F.A. (Eds.). **A mangabeira, as catadoras, o extrativismo**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém; Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju. p. 45-76, 2011.

SILVA, J.M. da. **Complexo lixa e queima das folhas em coqueiro-anão: avaliação de germoplasma e estratégias de controle químico por cyproconazole**. 2016. 83 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2016.

SIQUEIRA, L.A.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. **A introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 24p. 2002. Documentos, 47. Disponível em <http://www.cpat.embrapa.br>. Acesso em: 20 de abril de 2018.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R.C.; ENRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciências Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1048-1053, jul/ago. 2007.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.D.; NERY, F.C.; VARGAS, D.; SILVA, D.R.G. 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, 2011.

SOARES, A.N.R.; MELO, M.F.V.; VITÓRIA, M.F.; SILVA, A.V.C. Physiological quality of mangaba seeds submitted to drying. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 52, p. 4808-4813, 2015.

SOUZA, F.V.; KAYA, E.; VIEIRA, L.J.; SOUZA, E.H.; AMORIM, V.B.O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A.C.C.; LEDO, C.A.S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

VIDAL, R.F. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de genótipos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) nativos do litoral Cearense**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.14, p. 18-20, 2000.

VIEIRA, M.C. **Caracterização de frutos e mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) de Goiás**. 2011. 188p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G. E BORGHETTI, F. (Ed.) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 4 ed, p. 265-282, 2004.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas alcoólicas – Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher. 2010. 461p.

WANG, Q.C.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation–dehydration. **Plant Cell Tissue Culture**, v. 63, p.41-46, 2000.

WELEWANNI, I.; JAYASEKERA, A.; BANDUPRIYA, H. Coconut cryopreservation: present status and future prospects. **Cord**, v. 31, n. 1, p. 41-61, 2017.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, v.1, p. 297-330, 1998.

WU Y.; ZHAO Y.; ENGELMANN F.; ZHOU M. Cryopreservation of kiwi shoot tips. **Cryo Letters**, v.22, p. 277–284, 2001a.

WU Y; ZHAO Y.; ENGELMANN F.; ZHOU M.; ZANG D.; CHEN, S. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips. **Cryo Letters**, v. 22, p. 375–380, 2001b.

WU, Y.J.; HUANG, X.L.; CHEN, Q. Z., LI, X. J.; ENGELMANN, F. Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. var Zihua). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 161-168, 2007.

XU X.; CAI Z.; GU Q.; ZHANG Q. Cell ultrastructure of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) shoot tips during cryopreservation. **Agricultural Sciences in China**, p. 587–590, 2006.

YOKOMIZO, G.K.I.; DOS SANTOS, I.C.; DE FREITAS, A.C. Comparação de características produtivas entre progênies de meios irmãos de mangabeiras de populações do Amapá e da Paraíba. **Revista Agroambiente**, v. 11, n. 1, p. 63-70, 2017.

ZHAI, Z.; WU, Y.; ENGELMANN, F.; CHEN, R.; ZHAO, Y. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved in vitro cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. **Cryo Letters**, v. 24, p. 315-322, 2003.

ZHAO, Y.; WU, Y.; ENGELMANN, F.; ZHOU, M. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. **Cryo Letters**, v. 22, p. 321-328, 2001.

4. ARTIGO 1

CRIOPRESERVAÇÃO DE PLÚMULAS DE COQUEIRO ANÃO VERDE DO BRASIL DE JIQUI POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS

Periódico submetido (ou a ser submetido): Cryoletters

RESUMO

O desenvolvimento de estratégias *in vitro* para conservação e intercâmbio de germoplasma de coco (*Cocos nucifera* L.) é importante para a manutenção da diversidade genética dessa espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das soluções de vitrificação e do tempo de exposição na criopreservação de plúmulas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) pela técnica de vitrificação em gotas. Os explantes foram excisados de frutos maduros oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brasil. Os embriões foram desinfestados e as plúmulas, após a excisão, pré-cultivadas durante 72 horas em meio de cultura Y3 suplementado com sacarose 0,6 e 2,2 g L⁻¹ Gelrite[®]. As plúmulas foram expostas em soluções de PVS2 e PVS3 durante 15 e 30 minutos, e rapidamente imersas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após a criopreservação, foram descongeladas na solução de meio de cultura Y3 com 1,2 M de sacarose, e cultivadas em meio de regeneração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (soluções de vitrificação x tempos de exposição) com cinco repetições por tratamento. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey à probabilidade de 5%. Observaram-se diferenças significativas na porcentagem de calogênese para a interação entre soluções e tempo de exposição para as culturas não criopreservadas (-NL) e para o tempo de exposição após a criopreservação (+NL). O PVS2 e o PVS3, combinados com 15 minutos de exposição, promoveram a maior formação de calo (70 e 100%, respectivamente) nas culturas de controle. O tempo de exposição de 30 minutos, independente da solução de vitrificação, promoveu 30% da formação de calos embriogênicos após a criopreservação. Esses resultados contribuem para a conservação a longo prazo do coqueiro.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L.; crioproteção; PVS2; PVS3.

ABSTRACT
CRYOPRESERVATION OF BRAZILIAN GREEN DWARF COCONUT BY DROPLET-VITRIFICATION

The development of *in vitro* strategies for the conservation and interchange of coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm is fundamental to the maintenance of the genetic diversity of this species. This study aimed to evaluate the effect of the vitrification solutions and the exposure time on the plumules cryopreservation of Brazilian Green Dwarf coconut (BGD), using the droplet vitrification technique. Explants were excised from mature fruits from the Active Germplasm Bank of Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brazil. First of all, the embryos were disinfected, and plumules, after the excision, were pre-cultivated for 72 hours, in Y3 + 0.6 M sucrose + 2.2 g L⁻¹ Gelrite® culture medium. Plumules were exposed to PVS2 and PVS3 solutions for 15 and 30 minutes and rapidly immersed in liquid nitrogen (-196 °C). After cryopreservation, they were thawed in the culture medium solution (Y3 + 1.2 M of sucrose) and cultured in regeneration medium. The experimental design was completely randomized in a 2 x 2 factorial scheme (vitrification solutions x exposure times), with five replications per treatment. Data were compared by the Tukey's test at 5% probability. Significant differences were observed in the percentage of callogenesis for the solutions x exposure time interaction for the non-cryopreserved cultures (-NL) and the exposure time after cryopreservation (+NL). PVS2 and PVS3 combined with 15 minutes of exposure promoted the highest callus formation (70 and 100%, respectively) in the control cultures. The exposure time of 30 min, regardless of the vitrification solution, resulted in 30% of embryogenic callus formation after cryopreservation. These results contribute to the long-term conservation of coconut palm.

Key-words: *Cocos nucifera* L.; cryoprotection; PVS2; PVS3.

4.1. Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é também conhecido como "árvore da vida" porque cada componente da palmeira pode ser utilizado para consumo *in natura* ou transformado pela indústria. É uma planta tropical que apresenta uma gama de produtos e subprodutos para a utilização na alimentação humana, indústria da construção civil, cosméticos, farmacêutica e na produção de biodiesel. Por ser adaptado a solos de baixa fertilidade natural, é cultivado em mais de 86 países. Em 2016, o Brasil ocupou o quarto lugar mundial com a produção em torno de 2.649.246 toneladas (FAO, 2018).

A cocoicultura é expressiva na economia do Nordeste brasileiro, onde está localizada a maior parte da produção (71,36%; 684.501.049 mil frutos). Os maiores produtores dessa região são os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Sergipe. A região Norte com 13,54% e Sudeste com 14,20% da produção, também contribuem para o abastecimento nacional (IBGE, 2017).

A conservação dos recursos genéticos de coco é principalmente realizada por meio de coleções de campo, devido ao tamanho da semente e sua recalcitrância, dificultando seu armazenamento (N'NAN et al., 2008). A criopreservação compreende a conservação do material vegetal em temperatura ultrabaixa fornecida pelo nitrogênio líquido a -196 °C, ou em sua fase de vapor ao redor de -150°C (BERJAK et al., 2011). Desta forma, a técnica torna-se um procedimento viável para conservação de material biológico por longos períodos de tempo, necessitando de pouco espaço e manutenção (BENSON, 2008; SARTOR, 2012).

A criopreservação tem sido utilizada para a conservação de recursos genéticos em muitas espécies, especialmente recalcitrantes. Os primeiros estudos em coqueiro foram realizados por Assy-Bah e Engelmann (1992), por meio da técnica de vitrificação em embriões zigóticos maduros do coco PB 121 híbrido (anão amarelo da Malásia x gigante Africano), o anão vermelho dos Camarões, gigante Indiano e gigante de Rennel. Diversos pesquisadores publicaram resultados promissores com diferentes técnicas usando embrião zigótico, plumulas e pólen como explantes (KARUN; SAJINI, 2010; SAJINI et al., 2011; CUETO et al., 2014; MACHADO et al., 2014; WELEWANNI et al., 2017).

Existem poucos relatos na literatura sobre a criopreservação de embriões zigóticos de acessos coletados no Brasil, como o anão verde do Brasil de Jiqui e gigante do Brasil Praia do Forte. Pesquisas preliminares foram publicadas para avaliação da viabilidade de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) criopreservados, por meio de testes de condutividade eletrolítica e lixiviação de potássio (COPELAND-GOMES et al., 2012, 2015), porém, sem regeneração após a criopreservação.

Estudos recentes apontam a viabilidade da técnica para a criopreservação de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (LÉDO et al., 2018). No entanto, continua a existir uma necessidade de pesquisa voltada para a criopreservação da espécie, são necessários ajustes e adequação de protocolos de acordo com os genótipos. Além disso, técnicas de regeneração por embriogênese somática após a criopreservação, são mais interessantes sob ponto de vista do melhoramento e conservação de recursos genéticos por possibilitar a obtenção de maior número de plantas (NGUYEN et al., 2015).

Estudos com regeneração de plúmulas criopreservadas de coqueiro anão amarelo da Malásia submetidas ao encapsulamento-desidratação alcançaram apenas 20% de sobrevivência (N'NAN et al., 2008). A técnica de vitrificação que preconiza a crioproteção de explantes foi relatada para outros genótipos de coqueiro, com bom desempenho da solução de vitrificação 3 (PVS3) conforme NISHIZAWA et al. (1993). Sajini et al. (2011) reportam que as soluções de vitrificação PVS1, PVS2, PVS4 foram prejudiciais aos embriões zigóticos, exceto o PVS3.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito das soluções de vitrificação e tempo de exposição em plúmulas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVEBrJ) criopreservadas pela técnica de vitrificação em gotas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta, assepsia e isolamento do material vegetal

Foram utilizados frutos maduros de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVEBrJ), oriundos de três plantas matrizes do Banco Internacional de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil. No local de coleta dos frutos maduros (10-11 meses de idade) foram retirados os cilindros de endosperma contendo os embriões zigóticos, que foram submetidos à esterilização com imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% por 30 minutos, seguido da tríplice lavagem em água potável. Posteriormente, o material foi acondicionado em sacos plásticos estéreis e enviado ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe.

Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram excisados dos cilindros de endosperma. Em seguida foram submetidos à assepsia por meio da imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (2-2,5% v/v) por cinco minutos, e lavados três vezes em água destilada e estéril.

4.2.2. Pré-cultura, crioproteção, criopreservação, descongelamento e regeneração

Após a assepsia, os embriões foram pré-cultivados em placas de Petri de poliestireno estéreis 140 mm x 15 mm em meio Y3 (EEUWENS, 1976) contendo sacarose 0,6 M e 2,2 g L⁻¹ Gelrite® (adaptado de SAJINI et al., 2011). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e previamente autoclavado por 15 minutos em temperatura de 121 ± 1°C e pressão de 1,05 atm.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento por 72 horas com temperatura controlada de 25± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz. Após esse período, as plúmulas foram excisadas e expostas em soluções a 0°C de *Plant Vitrification Solution 2 - PVS2* (SAKAI et al., 1990): (30% (v/v) glicerol; 15% (v/v) etilenoglicol e 15% (v/v) dimetil sulfóxido-DMSO e *Plant Vitrification Solution 3- PVS3* (NISHIZAWA et al., 1993; KIM et al., 2009): 50% glicerol (w/v) e 50% sacarose (w/v), durante 15 e 30 minutos, e rapidamente imersas em nitrogênio líquido (-196 °C). Para tanto, gotas com 0,25 mL das soluções crioprotetoras foram dispostas com auxílio de pipeta de Pauster em tiras de papel alumínio (~ 5 mm x 15 mm, 05 gotas/tira de alumínio), e as plúmulas foram imersas nas gotas e mantidas por 15 e 30 minutos. Após cada tempo de exposição, as tiras foram imersas em nitrogênio líquido e inseridas em criotubos de poliestireno estéreis, capacidade 2 mL, e transferidos rapidamente para nitrogênio líquido por 24 horas (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Após a criopreservação, as plúmulas foram descongeladas em solução de carregamento composta pelo meio de cultura Y3 suplementado com 1,2 M de sacarose à temperatura ambiente de 25±2 °C por 15 a 20 minutos. Em seguida, foram cultivadas em placas de Petri de poliestireno estéreis 140 mm x 15 mm contendo meio de regeneração composto por sais e vitaminas do meio de cultura Y3 com 50 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 2,2 g L⁻¹ Gelrite®. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2 °C, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz até a formação das primeiras estruturas embriogênicas, quando foram transferidos para luz indireta (26 μmolm⁻²s⁻¹).

Para avaliação dos efeitos das soluções crioprotetoras em plúmulas expostas (+NL) e não (-NL) ao nitrogênio líquido, foram observadas aos 45 dias de cultivo *in vitro* a porcentagem de sobrevivência e a porcentagem de formação de calos embriogênicos.

4.2.3. Análises histológicas

A histologia foi observada de acordo com Castro (2009), onde amostras foram fixadas em solução FAA compostas de formaldeído; álcool 70% e ácido acético glacial (JOHANSEN, 1940). A desidratação foi realizada em série crescente etílica (80%, 90% e 100%) em intervalos de 1 hora cada. Posteriormente, as amostras foram colocadas em solução de pré-infiltração durante 2 horas e, em seguida, em solução de infiltração durante 24 horas na geladeira. A solução de inclusão foi preparada seguindo as proporções indicadas pelo kit de historesina (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) com a adição do endurecedor à resina ativada. Os fragmentos vegetais foram infiltrados em histomoldes e polimerizados em temperatura ambiente. Incluído o material, procedeu-se a microtomia utilizando o micrótomo rotativo semiautomático (SLEE, Mainz, Alemanha). Definindo-se a espessura de 8 μm , foram feitos os cortes que então foram estendidos sobre a lâmina contendo pequena quantidade de água. Após secagem em temperatura ambiente, as amostras de calos foram coradas em azul de toluidina com pH 4,8; e depois lavados com água acética. As lamínas após a secagem foram fixadas com verniz vitral e, posteriormente, observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100 acoplado à câmera Infinity 1), onde foram realizadas as fotomicrografias.

4.2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (2 soluções de vitrificação x 2 tempos de exposição) com cinco repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por dez plúmulas. Os dados foram transformados para arco-seno de $\sqrt{X+0,5}$ conforme pré-requisitos da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico SAS[®] (SAS versão 9.2, SAS Institute, 2010).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Efeito da solução crioprotetora e tempo de exposição na sobrevivência e indução de calos em plúmulas de coqueiro AVeBrJ não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL).

Houve efeito significativo do crioprotetor, tempo de exposição e interação dos fatores na porcentagem de sobrevivência e de calogênese de plúmulas não criopreservadas e do tempo na porcentagem de calogênese de plúmulas criopreservadas (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB) e de calogênese (%CALO) de plúmulas não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL) de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui em função da solução crioprotetora e tempo de exposição¹.

Fonte de variação	GL ²	QM ³ % SOB (-NL)	QM% CALO (-NL)	QM% SOB (+NL)	QM% CALO (+NL)
Crioprotetor (C)	1	20,8267**	90,0841**	2,3681 ^{ns}	0,8420 ^{ns}
Tempo (T)	1	47,8551**	23,8469**	0,3767 ^{ns}	145,2670**
C * T	1	30,3080**	23,8469**	0,0169 ^{ns}	0,8420 ^{ns}
Erro	16	3,9601	43,1823	0,7545	0,4863
CV (%)		6,02	20,79	9,27	25,88

¹ dados transformados para arco-seno $\sqrt{x+0,5}$; GL- Graus de liberdade, QM- Quadrado médio
ns - não significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

Houve alta porcentagem de sobrevivência das plúmulas não criopreservadas e criopreservadas nas diferentes soluções e tempos de exposição, entretanto não foi observada a

mesma resposta para a porcentagem de formação de calos em plúmulas criopreservadas (Tabela 2). O coqueiro é considerado uma das mais recalcitrantes espécies para a regeneração *in vitro* (PEREZ-NUNEZ et al., 2006) e provavelmente o processo de exposição ao nitrogênio líquido tenha contribuído para esse comportamento.

Observou-se em plúmulas não criopreservadas, a indução inicial (30 dias) de calos com coloração variando de esbranquiçada à tonalidade creme-amarelada (Figura 1A) em toda a superfície das plúmulas, de consistência não friável. Esse mesmo padrão morfogenético foi observado por Azpeitia et al. (2003) e Pérez-Nunez et al. (2006). Posteriormente, aos 45-60 dias da calogênese, houve a formação de estruturas com forma de -orelha translúcidas (Figura 1B) e, em seguida, o desenvolvimento de estruturas globulares. Esse padrão também foi constatado por Pérez-Nunez et al. (2006) em plúmulas criopreservadas de coqueiro anão verde da Malásia. As plúmulas criopreservadas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui apresentaram o mesmo desenvolvimento de plúmulas não criopreservadas, entretanto com início do processo mais tardio, em torno de 45 a 60 dias.

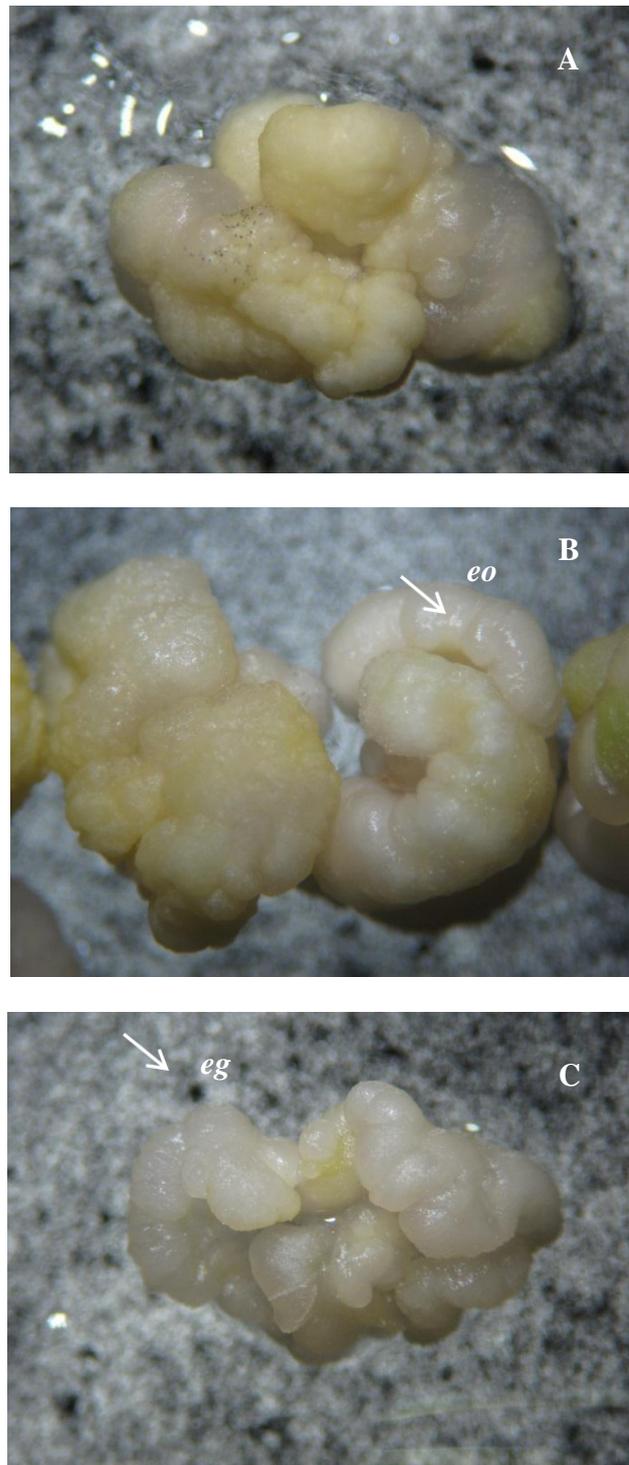


FIGURA 1. Desenvolvimento de calos embriogênicos em plúmulas não criopreservadas e criopreservadas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui. A- calos com coloração esbranquiçada a creme-amarelada; B- estrutura tipo -orehall (*eo*); C- estruturas globulares (*eg*). Fotos: Leila Albuquerque Oliveira.

A calogênese nas plúmulas submetidas ao PVS2 e PVS3, por 15 minutos, foi de 92% e 100%, respectivamente, e superior ao tempo de 30 minutos, 80 e 20%, respectivamente, em plúmulas não criopreservadas (-NL) (Tabela 2). Esse resultado indica que plúmulas do acesso AVeBrJ podem apresentar menor tolerância ao maior tempo de exposição em soluções crioprotetoras antes da criopreservação. Entretanto, Sajini et al. (2011) não observaram

variações na sobrevivência de embriões zigóticos de coqueiro gigante da Costa Oeste em diferentes tempos de exposição ao PVS3.

TABELA 2. Médias¹ da porcentagem de sobrevivência aos 30 dias e de calogênese aos 60 dias em plúmulas de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui não criopreservadas (-NL) e criopreservadas (+NL) em função da solução crioprotetora^{2,3} e tempo de exposição.

	% Sobrevivência -NL		Média	% Calogênese -NL		Médias
	15 minutos	30 minutos		15 minutos	30 minutos	
PVS2	92aA	80aB	86	18bB	66bA	42a
PVS3	100aA	20bB	60	100aA	100aA	100a
Média	96	50		59	83	
	% Sobrevivência +NL		Média	% Calogênese +NL		Médias
	15 minutos	30 minutos		15 minutos	30 minutos	
PVS2	96aA	92aA	94	0aA	30 aA	17,50a
PVS3	84aA	80aA	82	0aA	25 aA	12,50a
Média	90	86		0B	30A	

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

²PVS2-Solução de vitrificação 2 composta por 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etileno glicol, 15% (v/v) dimetilsulfóxido- DMSO (SAKAI et al., 1990)

³PVS3- Solução de vitrificação composta por 50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) (NISHIZAWA et al., 1993)

O tratamento composto da solução imersão em crioprotetora PVS3 por 15 minutos, em plúmulas não criopreservadas (-NL), promoveu 100% de sobrevivência e 100% calogênese. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de dimetilsulfóxido (DMSO) na composição da solução PVS3 e o menor tempo de exposição.

Considerando que a criopreservação envolve a crioproteção, conservação em temperatura ultrabaixa e descongelamento, o crioprotetor ideal deve proteger biologicamente as células durante essas etapas (KARTHA; ENGELMANN, 1994). Entretanto, diversos autores reportam a citotoxicidade e/ou estresse osmótico induzido pelo tempo de exposição e pelo DMSO, etilenoglicol e propilenoglicol (SAJINI et al., 2011). Estes autores, estudando diversas composições de soluções de vitrificação, obtiveram 75% de sobrevivência e 20% de regeneração em embriões zigóticos de coqueiro Gigante da Costa Oeste tratadas com PVS3 por 16 horas. Entretanto, no presente estudo, não foram observados efeitos tóxicos do DMSO em plúmulas não criopreservadas.

O maior tempo de exposição de 30 minutos promoveu, em média, maior indução de calos (30%) em plúmulas criopreservadas quando comparado com 15 minutos, não havendo diferença significativa entre as soluções crioprotetoras (Tabela 2).

4.3.2. Análises histológicas

A análise histológica evidenciou a seção de calo embriogênico mostrando o embrião somático globular (ESG), em que o tecido forma um anel ao redor do embrião contendo células meristemáticas. A maioria dessas células foi observada na zona periférica do calo, com uma coloração mais densa no citoplasma (Figura 2A). A seção de calo embriogênico mostrando a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD) indica a presença de células meristemáticas pequenas, densamente coradas, desenvolvidas em nódulos meristemáticos, localizados ao longo da zona periférica das estruturas embriogênicas, mas abaixo de uma camada de células coradas que formam a protoderme (PD) (Figura 2B). A análise histológica após a criopreservação mostrou a seção de calo embriogênico com a presença de células meristemáticas (CM), onde o embrião não revelou um meristema bem definido, mas revelou algumas camadas de células meristemáticas, com coloração densa do

citoplasma nos tecidos periféricos (Figura 2C). Em plúmulas criopreservadas, a seção de calo embriogênico mostra a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD) e a multiplicação do calo embriogênico com formação de nódulos meristemáticos, com células de tamanho grande, aglomeradas, tendo um pequeno núcleo e presença de protoderme (Figura 2D).

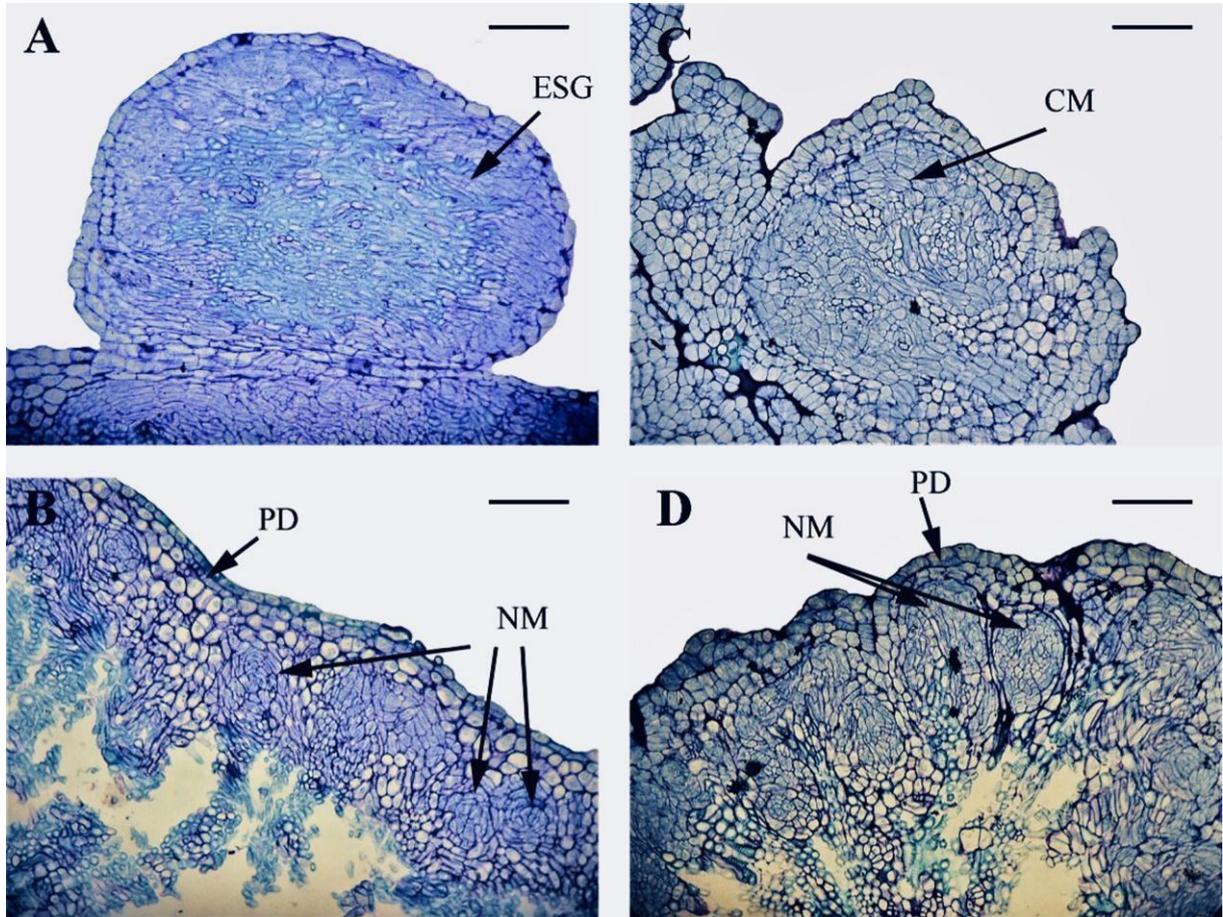


FIGURA 2. Seções histológicas de calos da cultura do coco formados antes (A e B) e após a criopreservação (C e D) da plúmula utilizando PVS2. **A-** Seção de calo embriogênico mostrando o embrião somático globular (ESG). **B-** Seção de calo embriogênico mostrando a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD). **C-** Seção de calo embriogênico mostrando a presença de células meristemáticas (CM). **D-** Seção de calo embriogênico mostrando a formação de nódulos meristemáticos (NM) e protoderme (PD). Barra de escala = 100 μm.

A utilização de plúmulas de coco como fonte de explantes promove possibilidades para a conservação do germoplasma dessa espécie, permitindo a manutenção da diversidade genética através de criobancos (N'NAN et al., 2008). Devido ao pequeno tamanho e da natureza livre de floema dos tecidos da plúmula, pode-se esperar que esse material seja livre de doenças, o que facilita assim a troca de germoplasma. De acordo com a análise histológica, inferiu-se que mesmo após a criopreservação das plúmulas, houve calogênese com formação das estruturas embriogênicas, o que indica que a multiplicação pode ser obtida com eficiência.

A presença de células meristemáticas, nódulos meristemáticos e protoderme após a criopreservação de plúmulas de coqueiro também foi observada por Pérez-núñez et al. (2006). Os autores destacaram que essas estruturas embriogênicas produzidas pelo calo embriogênico são capazes de formar embriões somáticos. A formação de estruturas ocorreu com poucos

dias de cultura e a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos foi mais rápida a partir da embriogênese somática primária usando explantes de plúmulas.

Dessa forma, as plúmulas criopreservadas que apresentaram padrão de desenvolvimento de calos embriogênicos aos 45-60 dias, quando submetidas ao PVS2 por 15 minutos, apresentaram 92% de calogênese, mantendo todas as estruturas necessárias para o desenvolvimento dos embriões somáticos globulares.

4.4. Conclusões

As soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 e o tempo de exposição de 30 minutos induzem maior quantidade de calos embriogênicos em plúmulas criopreservadas de coqueiro AVeBrJ.

O tempo de 15 minutos de exposição de plúmulas em PVS2 e PVS3 não apresenta efeito satisfatório de crioproteção das células.

Após a criopreservação das plúmulas não há mudanças nas estruturas celulares que comprometam o desenvolvimento de estruturas embriogênicas.

4.5. Referências Bibliográficas

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. **CryoLetters**, v. 13, p. 117-126, 1992.

AZPEITIA, A.; CHAN, J.L.; SAENZ, L.; OROPEZA, C. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured in vitro. **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, v. 78, p. 591-596; 2003.

BENSON, E.E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant cryopreservation- a practical guide**. New York: Springer. p. 15-32, 2008.

BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E.E.; HARDING, K.; MYCOCK, D.J.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, S.J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 65- 81, 2011.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009.

COPELAND-GOMES, K.K.P.; LEDO, A. da S.; ALMEIDA, F.T.C.; MIRANDA, R.P.; SANTOS, I.R.I. Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 8-13, 2012.

COPELAND-GOMES, K.K.P.; SANTOS, I.R.I.; ALMEIDA, F.T.C.; LEDO, A. da S. Performance of cryoprotectants, dehydration methods and tetrazolium test on the zygotic embryos of BGD coconut. **Scientia Plena**, v. 11, p. 1-7, 2015.

CUETO, C.; RIVERA, R.L.; KIM, H.H.; KONG, H.J.; BAEK, H.J.; SEBASTIAN, L.; PARK, J. Development of cryopreservation protocols for cryobanks of coconut zygotic embryos. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p. 297-30, 2014.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

FAO. Faostat – Statistic data base. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2018.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. 2017. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?loalidade=0&tema=76278 Acesso em: 27 de julho de 2018.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. Editorial McGraw Hill, London, UK, 1940. 523p.

KARTHA, K. K.; ENGELMANN, F. Cryopreservation and germplasm storage. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Eds). **Plant Cell and Tissue Culture**, Netherlands: Springer, p. 195-230, 1994.

KARUN, A.; SAJINI, K.K. **Cryopreservation f coconut zygotic embryos and pollen**. Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute, 18p. 2010. (Technical Bulletin, 63).

KIM, H.H.; LEE, Y.G.; SHIN, D.J.; KO, H.C.; GWAG, J.G.; CHO, E.G.; ENGELMANN, F. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. **CryoLetters**, v. 30, p. 320-334, 2009.

LÉDO, A. da S.; JENDEREK, M.; SKOGERBOE, D.; STAATS, E.; MACHADO, C.A.; OLIVEIRA, L.A.R. Cryopreservation of zygotic embryos of Brazilian Green Dwarf Coconut. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 514-517, 2018.

MACHADO, C.A.; MOURA, C.R.F.; RAMOS, S.R.R.; RIBEIRO, F.E. ; LEDO, A.S. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 36, p. 227-232, 2014.

NGUYEN, Q.T.; BANDUPRIYA, H.D.D.; LÓPEZ-VILLALOBOS, A.; SISUNANDAR, S.; FOALE, MADKINS, S.W. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. **Planta**, v. 242, p. 1059–1076, 2015. Doi: 10.1007/s00425-015-2362-9.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; AND MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by the vitrification method. **Plant Science**, v. 88, p. 67-73, 1993.

N'NAN, O.; HOCHER V.; VERDEIL, J-L.; KONAN, J.L.; BALO, K.; MONDEIL, F.; MALAURIE, B. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, v. 29, n. 4, p. 339-350, 2008.

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; CHAN, J.L.; SÁENZ, L. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 42, p. 37-43, 2006. <https://doi.org/10.1079/IVP2005722>.

SAJINI, K.K.; KARUN, A.; ARMARNATH, C.H.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **CryoLetters**, v. 32, n. 4, p.317-328, 2011.

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

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p. 30-33, 1990.

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

SAS Institute Inc. **SAS/Stat user's guide**: statistics. Version 9.2. Cary, NC.

WELEWANNI, I.; JAYASEKERA, A.; BANDUPRIYA, H. Coconut Cryopreservation: Present Status and Future Prospects. **Cord**, v. 31, n. 1, p. 41-61, 2017.

5. ARTIGO 2

EFEITO DO TEMPO DE DESSECAÇÃO NA UMIDADE DE SEMENTES E REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES DE MANGABEIRA

Periódico submetido (ou a ser submetido): American Journal of Experimental Agriculture

RESUMO

A *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, é uma árvore frutífera, nativa do Brasil e com ocorrência natural em várias regiões do país. Entretanto, diversos fatores têm contribuído para a redução das populações naturais dessa espécie, aliado à característica de recalcitrância de suas sementes, que dificulta seu armazenamento para fins de conservação. Dessa forma, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas se insere como estratégia complementar à conservação da variabilidade genética existente e permite acelerar a multiplicação de genótipos promissores. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de tempos de dessecação de sementes de mangabeira na umidade e na regeneração a partir de embriões criopreservados ou não. Foram utilizadas sementes extraídas de frutos de caída (maduros) e de vez (verde-maduros) de mangabeira oriundos do BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. As sementes, após 24 horas de sua extração dos frutos, foram submetidas à dessecação em caixas Magenta™ contendo sílica gel (50 g/magenta) por 0, 8, 10, 12 e 14 horas em temperatura ambiente. A umidade das sementes (quatro amostras de cinco sementes/maturação) foi determinada para cada período de dessecação. Após cada avaliação, as sementes foram inoculadas no meio de germinação (controle 2) e duas amostras de 10 sementes para cada tempo foram imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C). Para avaliação da porcentagem da germinação, as sementes foram descongeladas em solução de sacarose por 24 horas. Após esse período, os embriões foram excisados e inoculados em meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,3% de Phytigel® e avaliadas aos 60 dias. Sementes oriundas de frutos maduros apresentam maior porcentagem de germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas. Os tempos de dessecação afetam as variáveis de crescimento de plântulas oriundas de sementes de frutos de vez e maduros. A técnica de dessecação e vitrificação não promove a sobrevivência e regeneração de embriões zigóticos de mangabeira após a criopreservação. Estudos complementares devem ser conduzidos para obtenção da regeneração a partir de sementes criopreservadas.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes, conservação, criopreservação, recursos genéticos.

ABSTRACT
EFFECT OF DESICCATION TIME ON SEED MOISTURE AND REGENERATION OF MANGABA TREE EMBRYOS

Hancornia speciosa Gomes, popularly known as mangaba tree, is a fruit tree native to Brazil, with natural occurrence in several regions. However, some factors have contributed to the reduction of natural populations of this species, besides the recalcitrant characteristic of its seeds, which hinders their storage for conservation purposes. The application of plant tissue culture techniques is a complementary strategy to the conservation of the existing genetic variability and allows accelerating the multiplication of promising genotypes. This study aimed to evaluate the effect of desiccation period of mangaba tree seeds on moisture and regeneration, using cryopreserved and non-cryopreserved embryos. Seeds were extracted from mature and immature fruits of Caueira accession, belonging to Mangaba Tree Active Germplasm Bank of Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brazil. At 24 hours after seeds extraction, they were desiccated in Magenta™ boxes containing silica gel (50g/magenta) for 0, 8, 10, 12, and 14 hours, at room temperature. Seed moisture (four samples of five seeds/maturation) was determined for each desiccation period. After each desiccation period, seeds were inoculated in the germination medium (control 2), and two samples of ten seeds for each desiccation period were immediately placed in cryotubes and immersed in liquid nitrogen (-196 °C). For the evaluation of the percentage of germination, seeds were thawed in a sucrose solution for 24 hours. Afterward, embryos were excised and inoculated in MS culture medium with 3% sucrose and 0.30% Phytigel® and evaluated at 60 days of culture. Cryopreserved seeds regenerated no embryos. Further studies should be performed to obtain regeneration from cryopreserved seeds.

Key-words: *Hancornia speciosa* Gomes, conservation, cryopreservation, genetic resources.

5.1 Introdução

A *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera, pertencente à família Apocynaceae e à classe Dicotyledoneae. Apresenta ampla ocorrência geográfica no Brasil, sendo encontrada em várias regiões, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (MACHADO et al., 2004).

Os frutos da mangabeira apresentam polpa aromática, adocicada, com sabor característico, muito apreciados no mercado, tanto para serem consumidos *in natura* quanto para a indústria. Dessa forma, apresenta grande importância para a região Nordeste, pois garante o sustento e fornece alimento para milhares de famílias extrativistas. A mangaba é uma das frutas mais requisitadas pelas indústrias da região, pois o seu processamento resulta em vários produtos, como polpas, geleias, sorvetes, sucos, doces, bolos, biscoitos e licores (LIMA; SCARIOT, 2010; PERFEITO et al., 2015).

Dada a importância socioeconômica dessa espécie, insere-se a problemática do processo de erosão genética da mangabeira devido, principalmente, à ocorrência natural em áreas de acentuada especulação imobiliária e de intensa exploração agropecuária (SILVA JÚNIOR et al., 2015). A conservação do germoplasma de mangabeira já é realizada em campo por institutos de pesquisa e universidades, mas a vulnerabilidade dos acessos nesse tipo de conservação é alta, principalmente devido à incidência de pragas, doenças e intempéries climáticas, o que ressalta a importância do desenvolvimento de técnicas complementares de conservação, a exemplo da conservação de germoplasma *in vitro* (LÉDO et al., 2011).

Como alternativa a essa problemática, dentre as técnicas de conservação *in vitro*, insere-se a criopreservação, que visa a conservação de explantes por longos períodos e em temperaturas ultrabaixas, armazenando o material em nitrogênio líquido à temperatura -196 °C que permitem uma redução drástica do metabolismo celular e paralisa atividades da divisão celular, mantendo intacto o material biológico conservado (ENGELMANN, 2004).

Para que essa técnica apresente resultados promissores é necessário evitar a formação de cristais de gelo durante o processo, que são mais frequentes nas etapas do resfriamento e do aquecimento (MAZUR, 1984). A redução da água dos explantes a níveis extremamente baixos, capazes de evitar a formação desses cristais, pode ser considerada a etapa mais crítica na obtenção de um protocolo bem-sucedido de criopreservação (LOPES et al., 2013).

A vitrificação pode ser obtida por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Essa desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (SANTOS, 2001). A etapa de secagem proporciona redução do metabolismo celular, o que pode beneficiar o armazenamento, porém, em espécies sensíveis à dessecação, como a mangabeira, a retirada da água pode ocasionar danos irreversíveis às células, comprometendo a viabilidade das sementes (KOHOMA et al., 2006).

Alguns autores já descreveram trabalhos com a técnica da criopreservação aplicada a gemas laterais e meristemas apicais de mangabeira. Santos et al. (2015) relataram a eficiência das técnicas de vitrificação em gotas e vitrificação com mais de 70% de regeneração de ápices caulinares após a criopreservação. Também utilizando a técnica de vitrificação em gotas, Santos et al. (2015) obtiveram 90% de retomada de crescimento de ápices caulinares. Prudente et al. (2014) com as técnicas de encapsulamento-vitrificação e droplet-vitrificação de gemas laterais alcançaram 89 e 84% de regeneração, respectivamente. Entretanto, Silva (2010) não obteve sucesso com o emprego da técnica de vitrificação utilizando a solução de DMSO nas concentrações de 0, 5, 10 e 15%. Santos (2013), também não obteve resultado satisfatório com a mesma técnica e utilizando reidratação de forma osmocondicionada antes

da inoculação em meio de cultura. Estudos com a criopreservação de sementes e suas estruturas como embriões zigóticos e eixos cotiledonares são inexistentes. Entretanto, alguns estudos com espécies intermediárias como jenipapeiro (SANTOS; SALOMÃO, 2016), algodoeiro (LOPES et al., 2013) e café (SANTOS et al., 2002) obtiveram regeneração utilizando eixos embrionários.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes tempos de desidratação em sílica gel na capacidade regenerativa de embriões criopreservados de *Hancornia speciosa* Gomes.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes, sementes extraídas de frutos maduros (de caída) e verde-maduros (de vez) de mangabeira, coletadas do acesso Caueira do BAG Mangaba, localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. As sementes foram despulpadas manualmente e colocadas para secar em temperatura ambiente durante 24 horas em recipiente forrado com papel toalha, a fim de retirar o excesso de água.

Após a secagem das sementes foi realizada a etapa de assepsia, inicialmente com lavagem em solução de Tween 20[®] (1-2 gotas) e água estéril para a retirada total da polpa e, em seguida, em câmara de fluxo laminar foram imersas em álcool 70% por 2 minutos, e logo após, em solução de hipoclorito de sódio com 2-2,5% de cloro ativo durante 15 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas até a retirada total da polpa, e colocadas para secar em papel toalha por 24 horas em temperatura ambiente.

5.2.2 Efeito do tempo de dessecação na umidade e viabilidade de sementes de mangabeira

Para obtenção da porcentagem inicial de germinação das sementes (controle 1), quatro repetições de cinco sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% de sacarose e 0,3% de Phytigel[®] (meio de germinação).

Para os estudos do efeito da dessecação na germinação dos embriões de mangabeira, as sementes foram submetidas à dessecação acondicionadas sobre papel filtro estéril em frascos tipo Magenta[™] (77 mm × 77 mm × 97 mm) autoclavados contendo 50 g de sílica gel/frasco por 0, 8, 10, 12 e 14 horas em temperatura ambiente.

Para cada período de dessecação, três amostras de cinco sementes cada foram inoculadas no meio de germinação (controle 2) e quatro amostras de 10 sementes cada foram imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para determinação da umidade inicial das sementes, após cada período de dessecação, quatro repetições de cinco sementes foram pesadas para obtenção da massa fresca (MF) e transferidas para estufa por 24 horas em temperatura de 105± 3 °C para obtenção da massa seca (MS). A umidade foi determinada pela seguinte fórmula (RAS, 2009):

$$Umidade (\%) = \frac{Massa\ fresca - Massa\ seca}{Massa\ fresca} * 100$$

A porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea, da raiz e número de folhas foram avaliados aos 60 dias após a inoculação. Foi considerado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (dois tipos de maturação x cinco tempos de dessecação), com três repetições, sendo a parcela representada por 15 embriões.

5.2.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de embriões de mangabeira criopreservados

Para os estudos do efeito da dessecação na germinação, as sementes foram submetidas à dessecação em frascos tipo Magenta™ (77 mm × 77 mm × 97 mm) contendo 50 g de sílica gel cada por 0, 8, 10, 12 e 14 horas, em temperatura ambiente.

Após cada período de dessecação, três amostras de cinco sementes foram embebidas em solução de 0,3 M de sacarose durante 24 horas e depois desse período tiveram seus embriões excisados e inoculados no meio de germinação (controle 2). Foram separadas quatro amostras de cinco sementes cada sendo as mesmas imediatamente inseridas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para avaliação da porcentagem da germinação dos embriões, após a criopreservação, os criotubos foram descongelados por meio de imersão das sementes em solução de sacarose 0,3 M durante 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foram excisados os embriões e imediatamente inoculados em meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,3% de Phytigel®. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2 °C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz com intensidade luminosa de 60 μmolm⁻²s⁻¹.

As variáveis de crescimento, comprimento da parte aérea e da raiz e o número de folhas foram avaliadas aos 60 dias da inoculação, sendo que o tempo de dessecação de 14 horas não foi considerado devido ao desenvolvimento anormal das plântulas. Neste caso foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (dois tipos de maturação e quatro tempos de dessecação). Para a umidade e porcentagem de germinação foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (dois tipos de maturação e cinco tempos de dessecação).

5.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância para estudos de efeitos qualitativos e estimadas equações de regressão para os efeitos quantitativos, utilizou-se o programa estatístico SAS® (SAS versão 9.2, SAS Institute, 2010).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de frutos maduros e verde-maduros de mangabeira

Houve efeito isolado do tempo de dessecação e estágio de maturação dos frutos na umidade das sementes, não havendo efeito significativo da interação dos fatores. A umidade de frutos apresentou um comportamento linear ($y = -1,0783**x + 38,449$; $R^2 = 0,9855$ (Figura 1). No tempo T0 a umidade foi de 38,54%, com a exposição à sílica gel em diferentes períodos houve a redução do teor de água até 24,24% em 14 horas de dessecação. A sílica gel proporciona secagem rápida em ambiente asséptico (PÉREZ-GARCIA et al., 2007) por meio da adsorção da água nos poros de sua superfície (FIORE, 2013).

As umidades iniciais e finais forneceram valores diferentes, conforme a aplicação dos diferentes tempos de dessecação em sílica gel, com uma média de 10% de diferença, valor considerável quando se trata de criopreservação. No caso da mangabeira, suas sementes recalcitrantes apresentam um elevado conteúdo de água, reforçando a necessidade de redução da umidade nos embriões zigóticos (BERJAK et al., 2012). Ao testar a desidratação direta em embriões zigóticos de mangabeira, Santos (2013) observou uma umidade inicial de 66% e final de 25% após 120 minutos de desidratação.

Considerando o grau de maturação dos frutos, foi possível observar que sementes de frutos maduros apresentaram 33,68% de umidade significativamente superior às de frutos verde-maduros que alcançaram 24,24 % de umidade (Tabela 1).

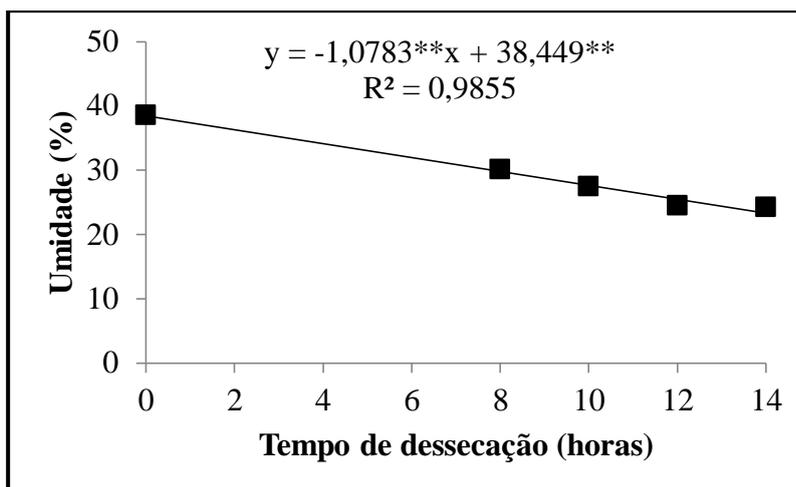


FIGURA 1. Efeito do tempo de dessecação na umidade de sementes de frutos de mangabeira.

TABELA 1. Médias¹ da umidade e porcentagem de germinação de embriões zigóticos de mangabeira em função do estágio de maturação dos frutos.

Estadio de maturação do fruto	Umidade (%)	Germinação (%)
Verde-maduro (de vez)	24,24b	42,67b
Maduro (de caída)	33,67a	65,33a
CV (%)	6,00	22,44

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.3.2 Efeito do tempo de dessecação na germinação e crescimento de embriões de mangabeira não criopreservados

Houve efeito significativo do tempo de dessecação e do estágio de maturação dos frutos isoladamente na porcentagem de germinação. Não houve efeito significativo da interação entre os fatores. A porcentagem de germinação apresentou um comportamento linear negativo ($y = -4,589**x + 94,384**$; $R^2 = 0,9043$, Figura 2). No tempo de 0h foi de 90% reduzindo até 20% com o aumento do tempo dessecação. Freire et al. (2011) também obtiveram alta porcentagem de germinação (92%) de embriões zigóticos de mangabeira não submetidos à dessecação. Santos (2013), utilizando a desidratação direta nos embriões de mangabeira observou 100% de germinação no tempo de 20 minutos. E após 120 minutos de desidratação, a germinação foi reduzida drasticamente para 33%.

Esses valores são superiores aos observados nesse estudo, o que indica que a dessecação das sementes e dos embriões propriamente ditos podem apresentar comportamentos diferentes de acordo com a técnica empregada. Segundo Engelmann (2011), a desidratação de embriões zigóticos tem como dificuldade o fato da complexidade de tecidos que compõem o embrião e têm uma sensibilidade diferenciada à desidratação.

Considerando o grau de maturação dos frutos (Tabela 1), foi possível observar 65,33% de germinação de embriões zigóticos oriundos de frutos maduros (de caída), significativamente superior a 42,67% de germinação de embriões de frutos verde-maduros (de vez).

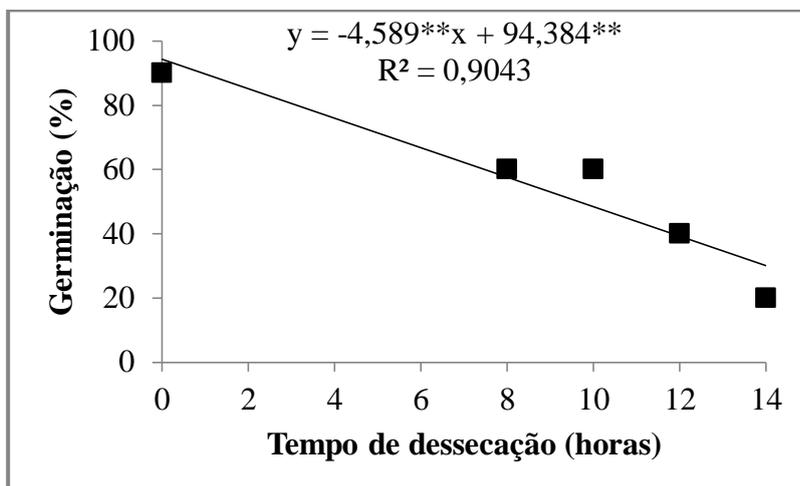


FIGURA 2. Efeito do tempo de dessecação na germinação de embriões zigóticos de frutos de mangabeira.

Houve efeito significativo do tempo de dessecação e do estágio de maturação dos frutos isoladamente nas variáveis: comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e número de folhas. Não houve efeito significativo da interação entre os fatores. O comprimento da parte aérea apresentou um comportamento linear negativo ($y = -0,1234**x + 4,5219**$; $R^2 = 0,7165$, Figura 3A). Em relação ao comprimento da raiz, a equação de regressão também apresentou um comportamento linear negativo ($y = -0,228**x + 4,3295**$; $R^2 = 0,8492$, Figura 3B). Apenas nessa variável o estágio de maturação não foi significativo para o desenvolvimento das plântulas (Tabela 2). A variável número de folhas apresentou comportamento polinomial ($y = -0,0237x^2$ ns - $0,3502x$ ns + $5,0685**$; $R^2 = 0,8322$, Figura 3C) diferente das demais variáveis analisadas.

De acordo com Santos (2013), a redução na porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e número de folhas está relacionada diretamente à desidratação, por esse processo promover modificações deletérias intracelulares que afetam o crescimento e desenvolvimento dos embriões. Segundo Berjak et al. (2012), a desidratação provoca alterações em diversas organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de golgi, o que compromete o metabolismo do embrião. Esses são os fatores que limitam a sobrevivência dos embriões zigóticos de espécies recalcitrantes à dessecação e congelamento em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011).

Considerando o grau de maturação dos frutos (Tabela 2), foi possível observar que o crescimento e desenvolvimento de plântulas oriundas de embriões zigóticos de frutos maduros (de caída) apresentaram maior incremento nas variáveis comprimento de parte aérea e número de folhas, sendo significativamente superior as plântulas oriundas de embriões zigóticos de frutos verde-maduros (de vez).

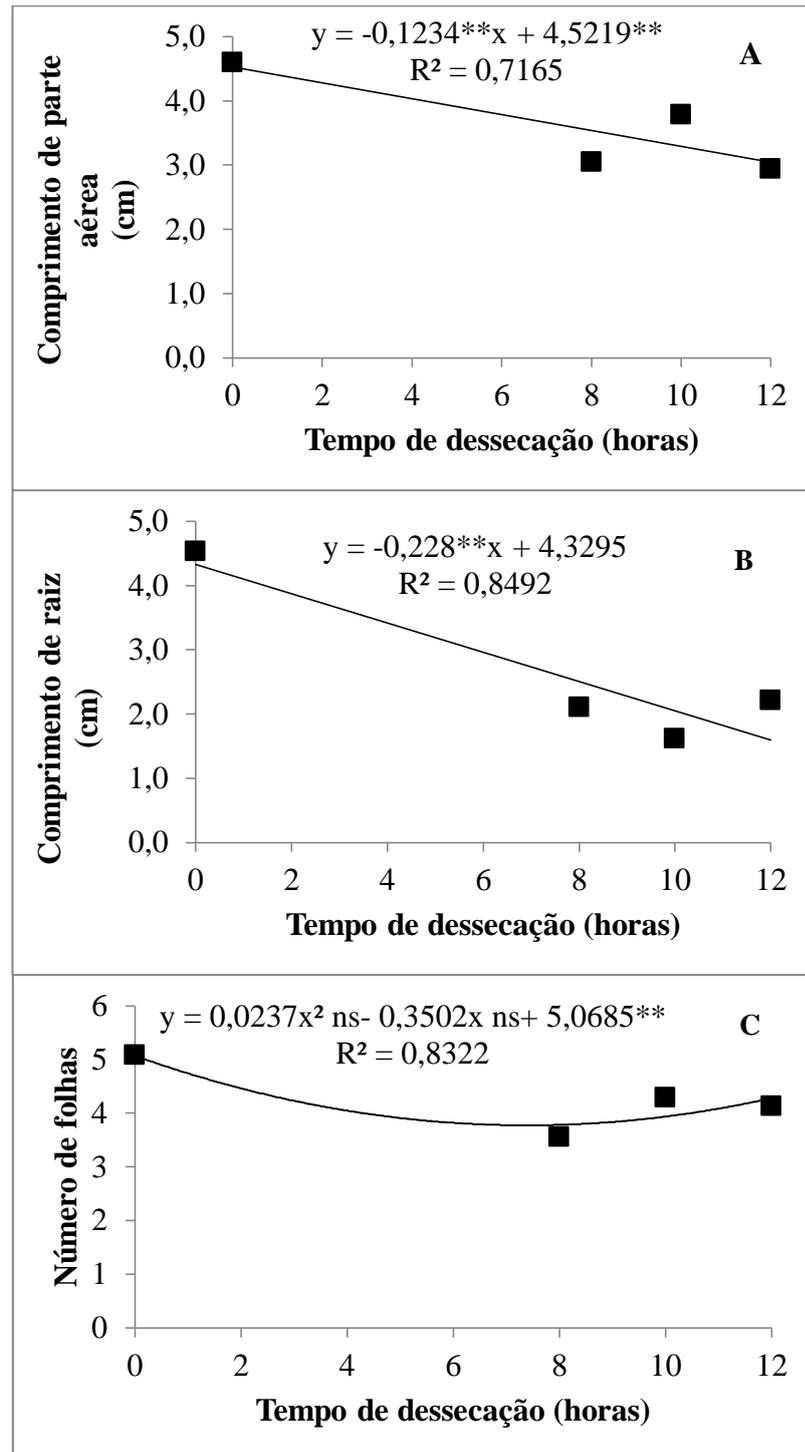


FIGURA 3. Efeito do tempo de dessecação de sementes no crescimento de plântulas de mangabeira obtidas de frutos maduros (de caída) e verde-maduros (de vez) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. A- comprimento da parte aérea; B- comprimento da raiz e C- número de folhas.

TABELA 2. Médias¹ comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR) e do número de folhas (NF) de plântulas oriundas de embriões zigóticos de mangabeira em função do estágio de maturação dos frutos.

Estadio de maturação do fruto	CPA (cm)	CR (cm)	NF
Verde-maduro (de vez)	2,97b	2,69a	3,80b
Maduro (de caída)	5,05a	3,05a	5,34a
CV (%)	34,30	58,06	42,85

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

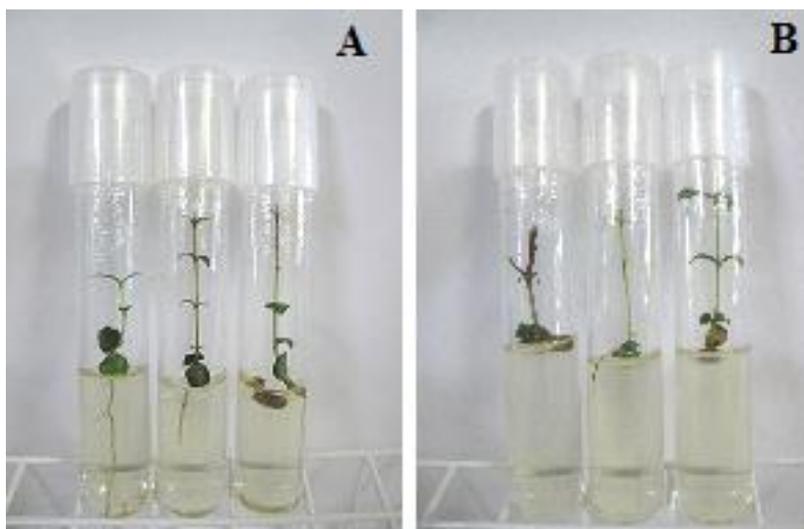


FIGURA 4. Regeneração dos embriões zigóticos e crescimento de plântulas de mangabeira obtidas de frutos maduros (de caída) e verde-maduros (de vez) após diferentes tempos de dessecação, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

5.3.3 Efeito do tempo de dessecação na regeneração e crescimento de embriões de mangabeira criopreservados

Aos 60 dias da inoculação de embriões zigóticos criopreservados de mangabeira, apenas um embrião exposto à dessecação por 12 horas emitiu a radícula. Em contrapartida, os embriões dos dois estádios de maturação, não criopreservados, germinaram (Figura 5A) com formação de plântulas normais em todos os tempos de dessecação. Não foi observada a oxidação dos embriões criopreservados que se mantiveram com coloração esbranquiçada (Figura 5B).

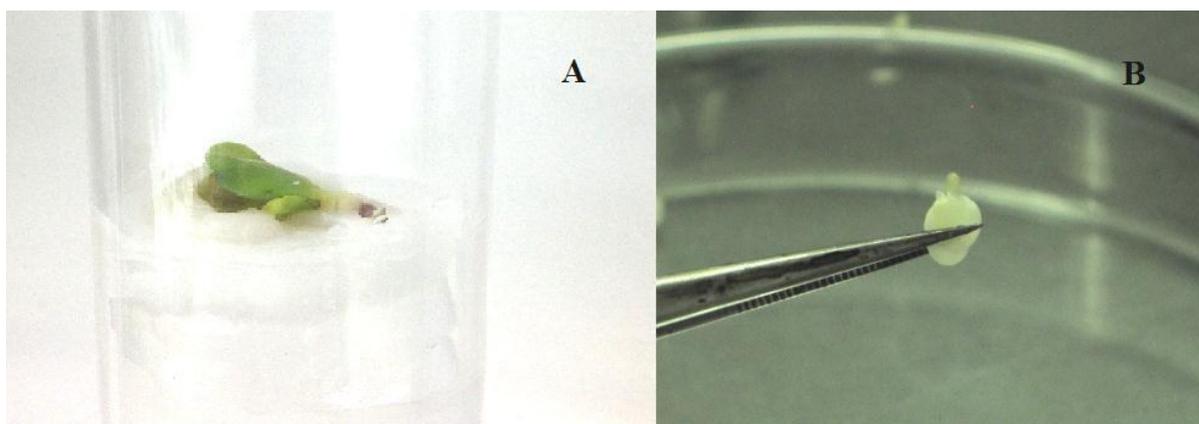


FIGURA 5. A- Embriões zigóticos não criopreservados com coloração esverdeada e início de regeneração; B- Embriões zigóticos criopreservados com coloração branca característica após a excisão.

A criopreservação de mangabeira já é realizada com sucesso em outros tipos de explantes, entretanto, o uso de embriões zigóticos ainda é um desafio. Silva (2010), aplicando a técnica de vitrificação, exposição de embriões em DMSO e sacarose, não observou a regeneração. Santos (2013), aplicando a dessecação em câmara de fluxo laminar seguida da reidratação osmocondicionada de embriões zigóticos de mangabeira também não obteve resultados satisfatórios.

É importante salientar que os embriões zigóticos de espécies recalcitrantes são formados por tecidos complexos e sensíveis, o que limita a sua sobrevivência à dessecação e congelamento em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). Entretanto, outros estudos apresentam resultados promissores utilizando outras espécies recalcitrantes. Santos et al. (2002) obtiveram 100% de regeneração *in vitro* de eixos embrionários de sementes de café (*Coffea arabica* L.) com 12,6% de umidade, após congelamento em nitrogênio líquido. Lopes et al. (2013) alcançaram resultados acima de 80% após a criopreservação de eixos embrionários de duas cultivares diferentes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) com umidade entre 9 e 16%.

De acordo com Santin et al. (2009), diversos fatores inerentes ao embrião podem afetar a criopreservação, como o estágio de desenvolvimento, a espécie a qual pertence e o método de produção. Os fatores da criopreservação como tipo de crioprotetor, velocidade da curva de congelamento e tipo de suporte físico para o embrião, formam outro grande leque de alternativas que influenciam na manutenção da viabilidade de embriões submetidos ao processo de criopreservação.

Pode-se inferir que a metodologia deve ser adaptada, pois os embriões advindos das sementes dos dois tipos de maturação germinaram e formaram plântulas normais, o que indica a viabilidade das sementes e a capacidade de regeneração da espécie mesmo sob a condição de dessecação. Dessa forma, há a hipótese de que algo no processo da criopreservação pode ser modificado. Uma possibilidade seria testar o ajuste da umidade entre 10% e 20%, apesar das sementes de mangabeira perderem seu poder germinativo rapidamente e não suportarem a perda brusca do conteúdo de água, é possível que a desidratação não tenha sido suficiente para impedir, de acordo com Santos (2001), a formação de cristais de gelo no meio intracelular que ocasiona a ruptura do sistema de membranas celulares e, conseqüentemente, o colapso das células e sua morte.

Outra possibilidade para futuras pesquisas é o tratamento com crioprotetores nas sementes, antes do armazenamento no nitrogênio líquido, podendo ser utilizados pré-tratamentos contendo prolina, sacarose, glicerol, como também combinações entre eles. Além disso, pode ser testado o descongelamento com soluções de menor concentração de sacarose que a empregada nesse estudo, já que sacarose em altas concentrações pode induzir o choque

osmótico e a redução do crescimento. Segundo Santos (2004), é importante definir concentrações específicas para cada espécie de interesse, já que diferentes tecidos de uma mesma planta podem apresentar limites diferentes de tolerância à presença de sacarose dentro de suas células.

Considerando que a espécie *Hancornia speciosa* Gomes apresenta sementes recalcitrantes, os dados obtidos nesse estudo permitirão que outras pesquisas sejam realizadas a partir dos fatores elucidados que afetaram a criopreservação, possibilitando que novas alternativas sejam empregadas para o estabelecimento de um protocolo satisfatório.

5.4 Conclusões

A umidade de sementes reduz com o aumento dos tempos dessecação nos dois estádios de maturação de frutos.

Sementes oriundas de frutos maduros possuem maior conteúdo de água.

A germinação reduz à medida que o tempo de dessecação aumenta.

Embriões zigóticos de frutos maduros apresentam maior porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Os tempos de dessecação afetam as variáveis de crescimento de plântulas oriundas de sementes de frutos verde-maduros e maduros.

A técnica de dessecação não promove a sobrevivência e regeneração de embriões zigóticos de mangabeira após a criopreservação.

5.5 Referências bibliográficas

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, J. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 171-186, 2012.

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

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

FIORE, C.L. Sílica gel para uso magistral. **Revista Técnica do Farmacêutico**, São Paulo, p.14-16, 2013.

FREIRE, K.C.S.; COELHO, G.G.; RUSSO, S.L.; SILVA, A.V.C., VA LÉDO, A. da S., SÁ, A.J.; MACHADO, C.A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2011.

KOHOMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C. J. Drying and storage of *Eugenia brasiliensis* Lam. ("Grumixameira") seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 72-78, 2006.

LIMA, I.L.P.; SCARIOT, A. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável da Mangaba. Brasília, Brazil: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2010.

- LOPES, K.P.; ALMEIDA, F.A.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; BRUNO, R.L.A. Criopreservação de eixos de embriões zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.
- LÉDO, A.S.; SA, A.J.; SILVA JUNIOR, J.F.; SILVA, A.V.C.; LEDO, C.A.S.; DINIZ, L.E.C. Establishment for in vitro propagation and conservation protocols of mangaba tree native of Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 918, p. 177-182, 2011.
- MACHADO, L.D.L.; RAMOS, M.L.G.; CALDAS, L.S.; VIVALDI, L.J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p.431-435, 2004.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 247, n. 3, p. 125-142, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437-497, 1962.
- PERFEITO, D.G.A.; CARVALHO, N.; LOPES, M.C.M.; SCHMIDT, F.L. Caracterização de frutos de mangabas (*Hancornia speciosa* Gomes) e estudo de processos de extração da polpa. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 3, p. 1-7, 2015.
- PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R.; NERY, F.C.; PAIVA, P.D.O.; REIS, M. V.; SILVA, L.C. Criopreservação de gemas laterais de mangabeira: o papel da prolina. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 86-93, 2014.
- PÉREZ-GARCIA, F.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; S.C.B.R. RAO, N.K.; DULLOO, M.E.; GHOSH, D.N.; LARINDE, M. **Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma**. Manuales para Bancos de Germoplasma. No. 8. Bioersity International, Roma, Itália, 164p. 2007.
- REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES, 2009. Brasília-DF. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária Mapa/ACS**.
- SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 561-574, 2009.
- SANTOS, I.R.I. **Criopreservação de germoplasma vegetal**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.20, maio/junho, p. 60-65, 2001.
- SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café** (*Coffea arabica* L.). Brasília: Embrapa CENARGEN, 2002. 4p. Comunicado Técnico, 69.
- SANTOS, I.R.I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de citrus usando o encapsulamento e desidratação**. Brasília, 24 p., 2004, Documentos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- SANTOS, P.A.A. **Cultivo e conservação in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2013. 94f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

SANTOS, P.A.A.; PAIVA, R.; SILVA, L.C.; SOUZA, A.C.; SANTANA, M.C.; SILVA, D. P.C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for longterm storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 289-296, 2015.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N. Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using in vitro culture. **International Journal of Agronomy**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

SAS Institute Inc. **SAS/Stat user's guide**: statistics. Version 9.2. Cary, NC.

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

SILVA JÚNIOR, J.F.; MOTA, D.M.; SCHMITZ, H.; RODRIGUES, R.F.A. Entre Tabuleiros, Restingas e Cerrados: a conservação in situ da mangabeira pelas comunidades tradicionais de extrativistas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E O CARIBE, 10. 2015, Bento Gonçalves. Recursos genéticos no século 21: de Vavilov a Svalbard: **Anais...** [S.l.]: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2015.