



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

**CRIOPRESERVAÇÃO DE MANGABEIRA E JENIPAPEIRO:  
DESAFIOS E PERSPECTIVAS**

**ANNA BEATRIZ NOGUEIRA DE ARAÚJO**

**2024**



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

**ANNA BEATRIZ NOGUEIRA DE ARAÚJO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE MANGABEIRA E JENIPAPEIRO: DESAFIOS E  
PERSPECTIVAS**

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”.

Orientadora  
Profa. Dra. Ana da Silva Lédo  
Coorientadora  
Dra. Annie Carolina Araújo de Oliveira

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL  
2024

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

A663c Araújo, Anna Beatriz Nogueira de.  
Criopreservação de mangabeira e jenipapeiro: desafios e perspectivas / Anna Beatriz Nogueira de Araújo; orientadora Ana da Silva Ledo. – São Cristóvão, SE, 2024.  
55 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –  
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Mangabeira. 2. Jenipapo. 3. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 4. Biotecnologia agrícola. 5. Plantas cultivares. I. Ledo, Ana da Silva, orient. II. Título.

CDU 582.937

**ANNA BEATRIZ NOGUEIRA DE ARAÚJO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE MANGABEIRA E JENIPEIRO: DESAFIOS E  
PERSPECTIVAS**

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 02 de julho de 2024.

Dra. Ana Veruska Cruz da Silva

PPGAGRI/Embrapa

Dra. Juliana Lopes Souza

Secretaria Municipal do Meio Ambiente

Documento assinado digitalmente  
 ANA DA SILVA LEDO  
Data: 30/07/2024 15:56:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana da Silva Léo  
Orientadora PPGAGRI/Embrapa

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL

*A Deus, aos meus avós maternos Mamãe Luzia  
e Papai Assis (in memoriam), familiares e  
amigos.  
**Dedico***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a Deus por me abençoar com saúde, sabedoria, paciência, perseverança e por não me deixar desistir nos momentos de ansiedade.

À querida Dra. Ana da Silva Lédo, minha eterna gratidão pela orientação, paciência, dedicação e incentivo que foram a luz no caminho durante todo o desenvolvimento deste estudo. Cada conselho e ensinamento recebidos serão tesouros guardados no baú da minha vida profissional, para sempre lembrados e valorizados.

À Profa. Dra. Renata Silva Mann por todo o carinho e orientação comigo durante os estágios de docência nesses dois anos e por me acolher em seu grupo de estudo.

Ao Prof. Dr. Rychardson Rocha pelo acolhimento em seus laboratórios, confiança no meu trabalho em auxiliar suas alunas e pelo grande carinho.

À minha mãe Lucilene Nogueira de Araújo, por todo amor, carinho, preocupação e incentivo, para que eu nunca desista dos meus sonhos e sempre comemorar comigo. Te amo!

Ao meu pai Julio Gomes de Araújo Junior, por todo carinho, amor e preocupação e por sempre está orando por mim e comemorando minhas conquistas. Te amo!

À minha tia Taty e ao meu primo Hugo, por sempre estarem comigo e por todo amor e carinho.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, que caminharam comigo entre os anos de 2022 a 2024, meu mais sincero obrigado por toda a camaradagem, companheirismo e apoio incondicional.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, quero expressar minha gratidão por oferecer não apenas a estrutura física necessária, mas também por todo o suporte humano que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), meu sincero agradecimento pela oportunidade concedida através da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), meu muito obrigado por abrir as portas para que eu pudesse seguir em frente nesta jornada de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Aos laboratórios de Geoprocessamento e Tecnologia (GEOTEC) e de Topografia Aplicada (LABTOP) do departamento de Engenharia Agrícola (DEAGRI) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), por todos os momentos bons vividos.

Às minhas amigas Marielly, Genillza e Mariana, que hoje são mais que amigas e sim irmãs. Agradeço muito por ter vocês em minha vida e por cada momento vivido, sendo de grandes risadas ou de choros, obrigada por todas as palavras de apoio, carinho, amor, conselhos, implicância, perturbações e brincadeiras. Uma sempre está disposta a ajudar a outra, amo vocês.

Ao Maryston, meu amor, por sua compreensão, incentivo e carinho que foram fundamentais para que eu pudesse superar os obstáculos e alcançar meus objetivos. Sua presença iluminou meus dias e sua paciência me fortaleceu.

Aos meus amigos Wendel, Mauricio, Vinicius (Bahia) e Ezio, por todo o carinho comigo e sempre está à disposição para me ajudar.

Aos meus amigos de graduação que estão presentes até hoje em minha vida, Gabriel, Ana Claudia, Jean, João e Clóvis.

Não poderia esquecer os meus queridos sobrinhos Pedro Bernardo e Davi, tia ama vocês.

Agradeço a todos que me apoiaram e contribuíram para a realização deste sonho.

## **BIOGRAFIA**

Anna Beatriz Nogueira de Araújo, filha de Lucilene Nogueira de Araújo e Júlio Gomes de Araújo Junior, nasceu em 17 de junho de 1998, na cidade de Petrolândia, interior de Pernambuco.

Morou até os 17 anos em Petrolândia, depois foi morar em Serra Talhada, onde cursou bacharelado em Engenharia Agrônoma na Universidade Federal Rural de Pernambuco Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), em 10 de dezembro de 2021 apresentou seu trabalho de conclusão do curso e em 27 de abril de 2022 concluiu a graduação, recebendo o título de Engenheira Agrônoma pela UFRPE/UAST.

Em agosto de 2022 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Sergipe (UFS). Realizou seus estudos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada em Aracaju, Sergipe. Submetendo-se à defesa da dissertação em 02 de julho de 2024.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Aspectos gerais do jenipapeiro .....	3
2.2. Aspectos gerais da mangabeira.....	4
2.3. Biotecnologia e conservação de recursos genéticos vegetais.....	5
2.4. Criopreservação de germoplasma vegetal: princípios e técnicas.....	6
2.4.1. Princípios.....	6
2.4.2. Técnicas.....	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	11
4. ARTIGO 1: CRYOPRESERVATION TECHNIQUES IN GENIPAP AND MANGABA: CHALLENGERS AND PERSPECTIVES .....	19
Abstract.....	19
4.1. Introduction.....	20
4.2. Cryopreservation techniques.....	21
4.3. Mains results published .....	22
4.4. Conclusion .....	27
4.5. References.....	28
5. ARTIGO 2: SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO PVS2 NA REGENERAÇÃO A ÁPICES CAULINARES DE MANGABA.....	31
Abstract.....	31
5.1. Introdução .....	33
5.2. Material e Métodos .....	34
5.2.1. Obtenção de plântulas assépticas (fonte de explantes) .....	34
5.2.2. Pré-cultivo.....	35
5.2.3. Crioproteção e criopreservação .....	35
5.2.4. Recuperação.....	36
5.2.5. Avaliações.....	36
5.2.6. Análises estatísticas .....	36
5.3. Resultados e Discussão .....	37
5.4. Conclusões .....	39
5.5. Referências Bibliográficas.....	39
6. ARTIGO 3: ESTUDOS SOBRE A MATRIZ DE ENCAPSULAMENTO DE ÁPICES CAULINARES DE JENIPAEIRO.....	42
Resumo .....	42
Abstract.....	43
6.1. Introdução .....	44
6.2. Material e Métodos .....	45
6.2.1. Material vegetal e assepsia .....	45
6.2.2. Excisão de ápices caulinares, encapsulamento e desidratação .....	45
6.2.3. Criopreservação, reaquecimento e regeneração.....	47
6.2.4. Análises estatísticas .....	48

6.3. Resultados e Discussão .....	48
6.4. Conclusões .....	51
6.5. Referências Bibliográficas .....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

## LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2	Página
Figura	
1	35
Assepsia de sementes de mangaba do acesso AB (Água Boa). <b>A-</b> Sementes lavadas e secas por 24h em temperatura ambiente. <b>B-</b> Imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 20min na câmara de fluxo laminar. <b>C-</b> Sementes assépticas.....	
2	36
Ápices caulinares de mangabeira acesso AB. <b>A-</b> Esbranquiçado (explante inviável); <b>B-</b> Amarronzado (explante oxidado); <b>C-</b> Esverdeado (explante viável).....	
3	37
Porcentagem de regeneração de ápices caulinares de mangabeira acesso AB imersos em PVS2 e não criopreservados após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	
4	38
Explantes de mangabeira acesso AB criopreservados (%) em função do tempo de exposição ao PVS2 <b>A-</b> Explantes viáveis (Esverdeados); <b>B-</b> Explantes inviáveis (Esbranquiçados).....	
ARTIGO 3	
Figura	Página
1	46
Etapas de encapsulamento. <b>A</b> – Excisão de plântulas de jenipapeiro; <b>B-</b> Ápices caulinares excisados; <b>C-</b> Ápices caulinares imersos em cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> ) para polimerização; <b>D-</b> Ápices caulinares encapsulados.....	
2	47
Ápices caulinares de jenipapeiro acesso AR4 encapsulados imersos por 24h em meio de crioproteção .....	
3	47
Criopreservação. <b>A-</b> Ápices caulinares encapsulados em criotubos; <b>B-</b> Cápsulas após criopreservação e remoção do excesso de meio reaquecimento .....	
4	50
Ápices caulinares de jenipapeiro acesso AR 4 encapsulados, desidratados em câmara de fluxos laminar por 4h e criopreservados. <b>A:</b> Ápices encapsulados e desidratados em câmara de fluxos laminar por 4h, <b>B:</b> Ápices viáveis com coloração verde até sete dias após criopreservação e na ausência de luz, <b>C:</b> Ápices com coloração escura (oxidação) após sete dias na ausência de luz.....	

## LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1		
Tabela		Página
1	Main cryopreservation technique articles published with genipap and mangaba.....	25
ARTIGO 2		
Tabela		Página
1	Classificação (escala de notas) das características de ápices caulinares de mangabeira observadas após o período de criopreservação durante regeneração.....	36
ARTIGO 3		
Tabela		Página
1	Porcentagem de regeneração de ápices caulinares sem (NL-) e com criopreservação (NL +), do acesso Arauá 4 de <i>Genipa americana</i> L. após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em função das matrizes de encapsulamento.....	48
2	Porcentagem de ápices caulinares viáveis (AV), oxidados (AO) e não oxidados (ANO) do acesso Arauá 4 de <i>Genipa americana</i> L. após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em função das matrizes de encapsulamento.....	49

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

$\mu$ M Micromolar

M Molar

Acesso AR 4 Acesso jenipapeiro Arauá 4 do BAG Jenipapo

Acesso AB Acesso mangabeira Água Boa do BAG Mangaba

ATM Atmosfera

BAG Mangaba Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira

BAG Jenipapo Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapeiro

BAP Benzilaminopurina

NL+ Tratamento imerso em nitrogênio líquido

NL- Tratamento não imerso em nitrogênio líquido

MS Meio de cultura estabelecido por Murashige & Skoog (1962)

$\frac{1}{2}$  MS Meio de cultura MS com metade da concentração de sais

PVS2 *Plant Vitrification Solution 2*

WPM Meio de cultura *Wood Plant Medium* estabelecido por Lloyd & Mc Cown (1981)

**RESUMO**

ARAÚJO, Anna Beatriz Nogueira. **Criopreservação de mangabeira e jenipapeiro: desafios e perspectivas.** São Cristóvão: UFS, 2024. 55p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). \*

A preservação de recursos genéticos vegetais tem impulsionado a pesquisa biotecnológica, especialmente em espécies de populações naturais como a *Genipa americana* (jenipapo) e a *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba). Essas plantas são de grande importância socioeconômica e cultural no Brasil, especialmente no estado de Sergipe, devido ao seu uso potencial na culinária e medicina. Este estudo tem como objetivo desenvolver e otimizar protocolos de conservação *in vitro* para *Genipa americana* L. e *Hancornia speciosa* Gomes, visando a preservação de germoplasma e recursos genéticos. Foram realizados dois experimentos para desenvolver protocolos de conservação para ambas as espécies. Para a mangaba, utilizou a técnica de vitrificação em gotas, onde os ápices caulinares foram expostos a solução de PVS2 por três tempos (10, 20 e 30 min). Os resultados indicaram que a exposição prolongada à solução de vitrificação PVS2 (30 minutos) afeta a regeneração dos explantes criopreservados. A adição de antioxidantes à solução ou a diminuição do tempo de exposição podem aumentar a eficácia desse método. No caso do jenipapo, os ápices caulinares foram expostos a duas matrizes de encapsulamento com alginato de sódio e cloreto de cálcio (MS PELNO -100% e ½ MS). Observou-se que a matriz de encapsulamento desempenha um papel crucial na proteção dos ápices durante a criopreservação, resultando em altas taxas de regeneração após o descongelamento. A matriz MS pleno (100%) apresentou os melhores resultados. Contudo, são necessárias otimizações adicionais para garantir a viabilidade dos explantes a longo prazo.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes, *Genipa americana* L., conservação *ex situ*, encapsulamento.

---

\* Comitê Orientador: Ana da Silva Lédo – UFS/Embrapa (Orientadora), Annie Carolina Araújo de Oliveira – CNPq/Embrapa (Coorientadora).

**ABSTRACT**

ARAÚJO, Anna Beatriz Nogueira. **Mangaba and genipap cryopreservation: challenges and perspectives.** São Cristóvão: UFS, 2024. 55p. (Master of Science in Agriculture and Biodiversity). \*

The preservation of plant genetic resources has driven biotechnological research, especially in natural populations of species such as *Genipa americana* (genipap) and *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba). These plants are of significant socioeconomic and cultural importance in Brazil, particularly in the state of Sergipe, due to their potential uses in cooking and medicine. The aim of this study was to develop and optimize in vitro conservation protocols for *Genipa americana* L. and *Hancornia speciosa* Gomes to preserve germplasm and genetic resources. Two experiments were conducted to develop conservation protocols for both species. For mangaba, the droplet vitrification technique was used, where shoot tips were exposed to the PVS2 solution for three lengths of time (10, 20, and 30 minutes). The results indicated that prolonged exposure to the PVS2 vitrification solution (30 minutes) affects regeneration of cryopreserved explants. Adding antioxidants to the solution or reducing exposure time may enhance the efficacy of this method. In the case of genipap, shoot tips were exposed to two encapsulation matrices with sodium alginate and calcium chloride [full-strength MS (100%) and ½ MS]. The encapsulation matrix plays a crucial role in protecting the shoot tips during cryopreservation, resulting in high regeneration rates after thawing. The full-strength MS matrix (100%) showed the best results. However, further optimizations are necessary to ensure the long-term viability of the explants.

**Keywords:** *Hancornia speciosa* Gomes, *Genipa americana* L., *ex situ* conservation, encapsulation.

---

\* Thesis Committee: Ana da Silva Ledo – UFS/Embrapa (Advisor), Annie Carolina Araújo de Oliveira – CNPq/Embrapa (Co-advisor).

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A conservação dos recursos genéticos nativos é de suma importância para a preservação da biodiversidade e para garantir a segurança alimentar e ambiental das gerações presentes e futuras. Os recursos genéticos representam a base de toda a vida na Terra, fornecendo os genes necessários para a adaptação das espécies às mudanças ambientais e para o desenvolvimento de novas variedades de plantas e animais (Lobato, 2023).

A erosão genética dessas espécies representa uma ameaça significativa para sua sobrevivência a longo prazo, pois reduz a diversidade genética dentro das populações, tornando-as mais suscetíveis a doenças, pragas e mudanças ambientais. Portanto, é fundamental implementar medidas eficazes de conservação, como a criação de áreas protegidas, a promoção do uso sustentável dos recursos naturais, a educação ambiental e o incentivo à agricultura ecológica (Rayol e Rayol, 2021).

No contexto específico das espécies de jenipapo e mangaba, ambas estão enfrentando sérios riscos de erosão genética devido a uma série de fatores, incluindo a perda de habitat, mudanças climáticas, práticas agrícolas insustentáveis, urbanização e exploração excessiva. Essas espécies são importantes não apenas por seu valor intrínseco como parte do patrimônio natural, mas também por seu papel nas culturas locais, na economia e na segurança alimentar de diversas comunidades (Silva et al., 2020; Moreira, Seidel e Godinho, 2023).

A *Genipa americana* L., popularmente conhecida como jenipapo, é uma árvore frutífera nativa das Américas, cultivada em todo o país e conhecida por seus frutos comestíveis e propriedades medicinais (Delprete, Smith e Klein, 2005; Ruzza et al., 2020). Já a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), típica da Mata Atlântica brasileira, tem seus frutos consumidos in natura e é amplamente utilizada na produção de doces, sucos e licores (Silva et al., 2021; Silva Junior, 2004). Ambas as espécies são exploradas por comunidades extrativistas devido à sua ocorrência natural, com colheita realizada de maneira sustentável (Yokomizo et al., 2017).

Devido à relevância econômica significativa, ampla dispersão geográfica natural e, sobretudo, à intensa influência das atividades humanas, é de suma importância obter um entendimento da diversidade e da estrutura genética das populações remanescentes dessas espécies. Essa compreensão se torna crucial para a formulação de estratégias eficazes de conservação tanto no ambiente de ocorrência natural (*in situ*) quanto fora dele (*ex situ*) (Gomes, 2020). A expansão de atividades agrícolas e imobiliárias também tem contribuído significativamente para a erosão genética desses recursos.

Métodos tradicionais de conservação de recursos genéticos, como bancos de germoplasma em campo, têm sido adotados pela Embrapa Tabuleiros Costeiros em colaboração com outras instituições no Brasil. No entanto, essas abordagens enfrentam desvantagens como presença de patógenos, catástrofes naturais (como secas prolongadas, incêndios e enchentes), desmatamento e exploração desordenada, além de altos custos de caracterização e monitoramento. A cultura de tecidos vegetais surge como uma estratégia complementar às abordagens convencionais. Investir na conservação dos recursos genéticos nativos, incluindo o jenipapo e a mangaba, é essencial para garantir a resiliência dos ecossistemas e a sustentabilidade das atividades humanas que dependem deles (Yokomizo et al., 2017).

A exposição das plantas ao nitrogênio, além da conservação, pode eliminar partículas virais dos tecidos vegetais, técnica denominada crioterapia (Martinková e Honek, 2007). Além de garantir ao laboratório economia em mão de obra, a criopreservação facilita o acesso aos bancos de germoplasma pelos pesquisadores,

sendo uma alternativa à manutenção em condições de campo, onde está sujeito à ação de pragas (Tresena et al., 2009). Neste caso, o material livre de doenças pode ser resgatado diretamente do laboratório, é uma técnica importante como apoio a programas de melhoramento genético vegetal (Lima, 2014; Gao et al., 2023).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais do jenipapeiro

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertencente à família Rubiaceae e possui 550 gêneros com aproximadamente 9000 espécies (Judd et al., 2008). É uma árvore frutífera nativa das Américas, conhecida por seus frutos comestíveis e por suas propriedades medicinais (Ruzza et al., 2020), popularmente conhecida no Brasil como jenipapeiro ou jenipapo (Delprete, Smith e Klein, 2005). O gênero *Genipa* encontra-se na subfamília Ixoroideae e na tribo Gardenieae, sendo reconhecido como um táxon que apresenta duas espécies apenas: *G. americana* L. e *G. infundibuliformis* Zappi & Semir. A primeira é nativa e cultivada em todo o neotrópico, desde o México até a Patagônia, e a segunda está somente referida para o Brasil centro-meridional (Erbano e Duarte, 2010).

Possui hábito arbóreo, que pode chegar a 25 m de altura, e encontra-se distribuída desde o Amapá até São Paulo e Mato Grosso, sendo cultivada nos pomares de todo o país, inclusive nos estados do Sul (Corrêa, 1984). Essa espécie possui em sua composição manitol, taninos, metil-éteres, hidantoína, ácidos tânicos (Revilla, 2001) e principalmente iridoides, característicos da família Rubiaceae. Dentre os iridoides glicosídicos isolados têm-se genipina (Djerassi, Gray e Kincl, 1960), ácido geniposídico (Guarnaccia et al., 1972) e geniposídeo (Jensen, 1983). Suas frutas são utilizadas na culinária, na medicina tradicional e na produção de corantes naturais.

Além disso, o jenipapo desempenha um papel importante na manutenção da biodiversidade como uma espécie hospedeira de diversas formas de vida, incluindo insetos, aves e mamíferos (Rovaris, 2020). É uma das maiores famílias de angiospermas, e uma das principais da flora brasileira (Erbano e Duarte, 2010), de grande importância social e econômica, pois o café, uma das bebidas mais consumidas mundialmente, encontra-se nela. Essas plantas da mesma família são utilizadas como ornamentais, para complemento alimentar, na medicina popular e como fitoterápica (JUDD *et al.*, 2008). Nativa das regiões tropicais das Américas, conhecida por suas diversas utilidades e propriedades. Além de produzir frutos que são utilizados na culinária e na medicina tradicional, o jenipapo também desempenha um papel importante na ecologia, fornecendo habitat e alimento para várias espécies de animais (Nascimento, 2020).

O jenipapo possui sementes classificadas como intermediárias, tolerando dessecação com baixo conteúdo de água (aproximadamente 5%), mas não podem ser armazenadas em temperaturas negativas (-20 °C) (Carvalho e Nascimento, 2000). Sementes de baixa longevidade possuem diferentes estratégias de germinação e estabelecimento de plântulas. Porém, não formam bancos de sementes ou formambancos transitórios (Garwood, 1989). A espécie apresenta uma rusticidade que a torna adaptável a várias condições edafoclimáticas, porém tem preferência por áreas com solos ligeiramente ácidos, com temperaturas médias entre 18 e 28 °C e precipitação anual entre 1200 e 4000 mm (Prudente, 2002).

O fruto é utilizado na alimentação de diversas formas na região Nordeste do Brasil. Apesar do uso frequente de seus frutos, a espécie ainda é explorada pela população nativa sob a forma extrativista, ela pode ser encontrada em quase todos os biomas, exceto nos pampas (Silva, Ledo e Silva Junior, 2020). A industrialização, sobas mais diferentes formas de aproveitamento do fruto, tem estimulado bastante o crescimento da demanda no mercado, possibilitando a expansão do fruto para outras regiões brasileiras (Prudente, 2002). Na região Nordeste, o cultivo dessa espécie ocorre em pequenos pomares, dentro de pequenas propriedades agrícolas, em fragmentos de populações naturais nas áreas de Mata Atlântica e em matas ciliares (Silva, Ledo e SilvaJunior, 2020).

Essa espécie possui em sua composição manitol, taninos, metil-éteres, hidantoína, ácidos tânicos (Revilla, 2001). Agra *et al.* (2008) relataram que a infusão das folhas é usada contra doenças do fígado e o fruto é considerado tônico contra anemias. A folha, quando cozida, serve como antidiarreica ou antissifilítica (Corrêa, 1984) e, quando macerada, é empregada por algumas tribos nativas como antifebril (Delprete, Smith e Klein, 2005). O caule, embora apresente taninos, tem efeito predominantemente purgativo e, em decocto, é indicado para o tratamento de ferida escorbútica, úlcera venérea, faringite granulosa e anemia, além de ser usado em contusões e luxações (Matos, 1999).

A conservação do jenipapo e de suas populações é essencial devido às ações antrópicas no habitat e à coleta indiscriminada (Figueiredo et al., 2018). Para proteger a espécie, são cruciais esforços para envolver a preservação de áreas naturais, práticas sustentáveis de colheita e medidas legais (Burle, 2019). A pesquisa científica, fundamental para compreender a biologia do jenipapeiro, contribui para estratégias de conservação mais eficazes. Contudo, desafios persistentes, como erosão genética, perda de habitat e exploração excessiva, ameaçam a espécie (Andrade et al., 2000).

## 2.2 Aspectos gerais da mangabeira

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) pertence à família das Apocinaceas, sendo nativa de várias regiões do Brasil. Cresce de forma espontânea no Nordeste, desde os Tabuleiros Costeiros até as Baixadas Litorâneas, preferindo solos profundos, pobres e arenosos (Fonseca et al., 2003). Além disso, os frutos são ricos em vitamina C e são amplamente consumidos in natura, na produção de doces, sucos e licores (Silva et al., 2021). É cultivada em áreas de Cerrado no Centro-Oeste e é encontrada nas regiões Norte e Sudeste (Vieira Neto et al., 2007).

Além de seu valor gastronômico, a mangabeira possui importância cultural e econômica para muitas comunidades, sendo também utilizada na medicina popular com o uso da casca, que possui propriedades adstringentes, e o látex, usado contra pancadas, inflamações, diarreia, tuberculose, úlceras e herpes. O chá das folhas é amplamente empregado para cólicas menstruais (Silva Junior, 2004). No entanto, a agricultura e a expansão urbana têm exercido pressão sobre várias populações naturais dessa espécie, resultando em erosão genética (Sá et al., 2011).

Recentes estudos revelaram que o látex da mangabeira possui propriedades anti-inflamatórias indicando seu potencial medicinal. A árvore também tem valor econômico devido aos seus frutos, que são consumidos in natura e podem ser usados em sucos, doces e geleias (Moura et al., 2011). Pesquisas mostram que o extrato das folhas tem efeitos anti-hipertensivos e dilata os vasos sanguíneos (Pereira et al., 2012). Estudos adicionais destacam as suas propriedades medicinais, incluindo sua capacidade anti-hipertensiva demonstrada em estudos *in vitro* (Serra et al., 2005), bem como sua

atividade vasodilatadora (Ferreira et al., 2007). Moléculas presentes nos frutos também foram observadas inibindo processos inflamatórios (Morais et al., 2012).

No entanto, não existem variedades selecionadas disponíveis, apenas seleções realizadas pela Emepa-PB (Silva Júnior, Rodrigues e Mota, 2023). Dentre os genótipos recomendados pela Emepa-PB, destacam-se a IPA 20, IPA 23, IPA 24 e IPA 38 (Nascimento, Cardoso e Coccozza, 2014). Esses genótipos têm potencial para serem utilizados em programas de melhoramento genético da mangabeira, visando o desenvolvimento de variedades mais produtivas e adaptadas às condições locais. A mangabeira está ameaçada de extinção devido ao rápido desenvolvimento urbano em áreas litorâneas. As técnicas de criopreservação são consideradas aliadas importantes para a preservação dessa espécie (Sartor, Moraes e Almeida, 2012), permitindo o armazenamento de germoplasma por tempo indefinido, mantendo a estabilidade genética e as características fenotípicas, ocupando pouco espaço e exigindo poucamanutenção.

Embora a exploração da mangabeira no Nordeste seja principalmente extrativista, há um movimento crescente em direção ao cultivo para atender à crescente demanda. No entanto, apesar do reconhecimento crescente de sua importância, as comunidades tradicionais que dependem da coleta de mangaba permanecem em grande parte desconhecidas, dificultando iniciativas para melhorar suas condições de vida e preservar os habitats naturais da fruta, que enfrentam ameaças devido à especulação imobiliária em áreas turísticas (Santana et al., 2022).

As catadoras de mangaba em Sergipe representam uma conexão vital entre as comunidades locais, a natureza e a cultura. Desempenham um papel fundamental na preservação da mangabeira, na geração de renda e no fortalecimento das tradições locais, merecendo reconhecimento (Salinas, 2020).

### 2.3 Biotecnologia e a conservação de recursos genéticos vegetais

Os avanços significativos na biotecnologia moderna, abrangendo técnicas como transgenia, clonagem, micropropagação e manipulação genética, revolucionaram o melhoramento vegetal (George, 1993; Alves, 2020). Essas inovações permitem a multiplicação de genótipos superiores, produção de plantas transgênicas, eficiência na indução de mutações e seleção, conservação de germoplasma, entre outros benefícios.

Os recursos genéticos são fundamentais para mitigar a fome, os prejuízos econômicos e os desafios agrícolas causados por condições climáticas adversas, doenças e práticas agrícolas (Burle, 2019). Eles desempenham um papel crucial em programas de melhoramento, contribuindo para o aumento da produtividade e qualidade em setores como agricultura, pecuária, silvicultura e pesca, além de possibilitar o desenvolvimento de novas variedades, raças, medicamentos e outros produtos de consumo. A conservação *ex situ*, realizada fora do ambiente natural, é crucial para preservar uma representação da biodiversidade e é essencial para pesquisas, especialmente aquelas voltadas para o melhoramento genético (Oliveira et al., 2023).

Diversos métodos, como conservação de sementes, cultura de tecidos vegetais, bancos de germoplasma e núcleos de conservação, e a conservação *in situ* são empregados para manter esses recursos genéticos (Jaramillo e Baena, 2002). A cultura de tecidos vegetais envolve o cultivo asséptico de partes vivas da planta (explantes), como tecidos, órgãos ou células, em meio de cultura artificial, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, com o objetivo de gerar uma novaplanta (Lameira et al., 2000). Ela utiliza explantes, que são segmentos de tecido ou órgão vegetal, para iniciar uma cultura *in vitro* (Andrade, 2002). Esses explantes podem

ser fragmentos de folhas, raízes, caules ou qualquer tipo de tecido que possa induzir a regeneração vegetal *in vitro* (Torres et al., 2000). A escolha do explante depende do objetivo final do projeto da cultura de células, e é importante considerar o estado fitossanitário, fisiológico e nutricional da planta doadora *in vivo*, sendo que quanto mais jovem a planta, melhores são os resultados (Lameira et al., 2000).

Entre as técnicas de conservação a partir da cultura de tecidos vegetais, destacam-se o crescimento lento de curto e médio prazos e a criopreservação de longo prazo. Protocolos de conservação por crescimento lento já foram estabelecidos para o jenipapeiro e a mangabeira. No entanto, a criopreservação de materiais genéticos vegetais permite a conservação de meristemas, embriões, sementes e outros tecidos da planta por tempo indeterminado, a temperaturas ultrabaixas (-196 °C) em tanques de nitrogênio líquido. Essa técnica paralisa o crescimento celular e a multiplicação, permitindo a formação de um banco de germoplasma em um espaço reduzido por longo tempo (Carvalho e Vidal, 2003; Sartor, Moraes e Almeida, 2012). Protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos para mais de 80 espécies de plantas cultivadas sob várias formas, incluindo suspensões de células, calos, ápices, embriões somáticos e zigóticos (Jaiswal e Vagga, 2022). Diversas técnicas têm sido empregadas, como a vitrificação em gotas e o encapsulamento, especialmente para espécies frutíferas (Copatti, 2021; Ledo et al., 2020; Oliveira et al., 2023; Normah et al., 2019; Gonzalez- Arnao et al., 2020; Valdés et al., 2021).

Para o jenipapeiro, que é considerado uma espécie intermediária, resultados promissores foram alcançados com a criopreservação de eixos embrionários e sementes (Sá et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Santos e Salomão, 2016; Oliveira et al., 2016; Nascimento et al., 2020; Souza et al., 2023). No entanto, para a mangabeira, uma espécie recalcitrante, os resultados têm sido variados (Santos et al., 2015; Malschitzky et al., 2021; Pedral et al., 2021; Santana et al., 2022).

## 2.4 Criopreservação de germoplasma vegetal: princípios e técnicas

### 2.4.1 Princípios

A criopreservação vegetal, também conhecida como armazenamento de propágulos vegetais em temperatura ultrabaixa, chega a -196 °C em nitrogênio líquido ou em sua fase de vapor a -150 °C (Santos e Salomao, 2023; Souza et al., 2024). Geralmente o nitrogênio líquido (NL) é a única opção disponível em conservação segura e rentável, em longo prazo, dos tecidos que seriam recuperados por meio de protocolos para a manipulação posterior (Carvalho et al., 2021; Mosa et al., 2023). É uma tecnologia de baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, apresenta baixo risco de variações somaclonais e facilidade de manuseio, além de permitir o intercâmbio de germoplasma (Rai et al., 2009). Esta técnica de conservação dos recursos genéticos vegetais tem apresentado bons resultados em virtude de reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade em nível celular, minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (Rocha et al., 2009; Gao et al., 2023).

A regulação do teor de água presente nas células e sua transferência entre os ambientes intra e extracelular são elementos cruciais na formulação de um procedimento de criopreservação eficaz (Pettinelli, 2014). Por essa razão, antes de ser submetido ao congelamento, o material deve passar por um processo de remoção de água, que pode ser realizado fisicamente, através da dessecação ao ar em uma câmara defluxo laminar ou com o uso de sílica gel (Chmielarz et al., 2011), ou por meio de crioprotetores que induzem uma desidratação osmótica característica do processo de

vitrificação. Essas abordagens têm como objetivo extrair a quantidade máxima de água presente no compartimento celular, proporcionando proteção contra a formação decristais de gelo que poderiam surgir durante o processo de congelamento (Carvalho et al., 2021).

A viabilidade dos tecidos vegetais durante a criopreservação está intimamente ligada à capacidade de tolerância à desidratação (Nascimento, 2020). Cada espécie apresenta um nível de umidade ideal para a sobrevivência durante o congelamento e descongelamento (Pettinelli, 2014). Portanto, a avaliação da desidratação celular é crucial, pois indica se os componentes celulares se ajustam adequadamente às condições de estresse osmótico (Bhushan et al., 2011). Pesquisas anteriores destacam a necessidade de tratamentos criogênicos específicos para plantas tropicais, a fim de promover artificialmente a desidratação celular e induzir a tolerância a temperaturas ultrabaixas, uma vez que essas espécies não desenvolvem naturalmente.

Pode ser utilizada para todos os tipos de explante, tais como: meristemas, suspensões celulares, embriões (somáticos, zigóticos ou nucelares) e protoplastos. De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (Engelmann, 2011).

A técnica de criopreservação de eixos embrionários tem se destacado como o método mais apropriado para a conservação em longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos toleram condições que seriam letais para a semente inteira (Carlo e Lambardi, 2005). Estudos recentes envolvendo a criopreservação de eixos embrionários de jenipapeiro mostraram que a dessecação com sílica gel resultou em uma redução na viabilidade e germinação das sementes de *Genipa americana* (Souza et al., 2023). Os autores notaram que o teor inicial de água das sementes era tão elevado (47%) que o armazenamento em nitrogênio líquido (NL) sem tratamento prévio de desidratação levou à mortalidade das sementes.

No entanto, observou-se que a desidratação em sílica gel por um tempo mínimo de 20h (correspondente a 14% de teor de água) proporcionou uma maior tolerância ao congelamento, resultando no sucesso da criopreservação. Santos e Salomão (2016) perceberam que todos os eixos embrionários de controle (LN-) obtiveram 43,89% de umidade e que germinaram após 21 dias de cultivo *in vitro*. Estas altas porcentagens de germinação persistiram mesmo após a irrigação. Eixos embrionários desidratados exibiram altas taxas de germinação (entre 93 e 96%) após o congelamento, mesmo quando a umidade das sementes foi reduzida para valores tão baixos quanto 6,79%.

Nascimento et al. (2020) demonstraram que a criopreservação de sementes de *Genipa americana* e posterior recuperação por meio de eixos embrionários, usando sílica gel e nitrogênio líquido, foi eficaz, resultando em alta sobrevivência (100%) e crescimento normal das mudas após a aclimatação. A dessecação em sílica gel prejudicou a umidade de ambos os acessos, com germinação de 100% para o acesso Umbaúba em todos os tempos de dessecação antes da criopreservação. No entanto, o acesso Núcleo Bandeirante foi mais sensível à dessecação, apresentando apenas 10% de germinação em 20h. Apesar das alterações nas ultraestruturas do eixo embrionário causadas pelo tempo de dessecação, não houve influência na regeneração dos acessos criopreservados, destacando a eficiência da criopreservação de embriões zigóticos para conservação de espécies vegetais com sementes de armazenamento problemático (Kilson et al., 2013).

## 2.4.2 Técnicas

Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre alguma delas depende da espécie e do explante a ser criopreservado (Panis e Lambardi, 2005). Uma das técnicas de criopreservação desenvolvida recentemente é a *droplet vitrification* (vitrificação em gotas) que envolve várias etapas importantes, como pré-tratamento, pré-condicionamento, pré-cultura, osmoproteção, desidratação, resfriamento, aquecimento e proteção (Sakai et al., 2008). O tratamento dos explantes com solução devitrificação (*Plant Vitrification Solution – PVS*) é um dos ganhos mais importantes e ocorre com o uso de uma combinação de crioprotetores (Engelmann, 2011). As duas soluções mais utilizadas em espécies vegetais são: (i) a solução PVS2 (Sakai et al., 1990), composta de 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) de etileno glicol, 15% de DMSO (v/v) e 0,4 M de sacarose, e (ii) a solução PVS3 (Nishizawa et al., 1993) 50% de glicerol e 50% de sacarose (v/v), opcionalmente em meio MS líquido.

A vitrificação é um processo físico que ocorre em temperaturas extremamente baixas, onde o conteúdo dentro das células congela devido à presença de uma solução altamente concentrada de crioprotetores. Durante esse processo, o estado líquido do conteúdo celular se transforma em um estado vítreo, sem a formação de cristais. Esse fenômeno ocorre porque, durante o congelamento, os solutos dentro das células se concentram, mantendo o equilíbrio osmótico com o ambiente externo e protegendo o tecido contra a desidratação excessiva, o que mantém o volume celular. Além disso, o congelamento leva a um bloqueio metabólico, impedindo a difusão molecular dentro e fora das células e evitando a formação de cristais de gelo (Armitage e Rich, 1990).

Essa transição para o estado vitrificado permite que o material tolere variações rápidas de temperatura, tanto no resfriamento quanto no aquecimento, e mantenha a estabilidade celular durante o armazenamento em nitrogênio líquido. Essa estabilidade é crucial, pois impede alterações físicas e químicas durante o processo de desidratação (Arnão et al., 2008). As técnicas de vitrificação derivam desse processo natural e são alcançadas pela desidratação dos tecidos por meio da exposição artificial a soluções concentradas de crioprotetores químicos durante o pré-tratamento (Engelmann, 2007; Souza et al., 2023).

Atualmente, diferentes protocolos de vitrificação estão sendo desenvolvidos, variando a composição das soluções crioprotetoras. Substâncias como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, glicerol e propileno glicol são comumente utilizadas (Os protocolos também variam em relação ao tempo de exposição e às etapas de crioproteção necessárias, adaptando-se às características fisiológicas de cada espécie. Essa técnica tem sido amplamente aplicada em espécies de clima tropical, muitas das quais possuem potencial medicinal (Ozudogu et al., 2012; Chua et al., 2011).

Recentemente, foram desenvolvidas técnicas adaptativas, como encapsulamento/vitrificação ou encapsulamento/desidratação, onde o explante é envolvido por uma cápsula feita de alginato de sódio, geralmente antes de passar pelos procedimentos de desidratação. Essas técnicas permitem o uso de concentrações mais elevadas de crioprotetores durante a pré-cultura, resultando em maior tolerância à desidratação, a qual poderia ser prejudicial ao explante sem essa forma de proteção. A cápsula de alginato de sódio não apenas oferece proteção, mas também fornece nutrientes para o explante durante todas as etapas de pré-tratamento (Pereira et al., 2008; Nascimento et al., 2020).

Estudos recentes têm investigado diferentes técnicas de criopreservação para a mangaba em longo prazo. Nogueira (2010) realizou estudos com calos de mangaba, demonstrando que o pré-tratamento com a solução B (meio de cultura +0,4 M de

sacarose + 8% DMSO) resultou em alta viabilidade celular (68,8%) e aumento na produção de matéria fresca (45%), enquanto soluções de vitrificação PVS2 (3,26 M de glicerol + 2,42 M etileno glicol + 1,9 M DMSO + 0,4 M de sacarose) e PVS2 modificado (40% de glicerol + 10% etileno glicol + 10% DMSO + 45% de sacarose) apresentaram queda considerável de 60% na viabilidade celular. Sartor, Moraes e Almeida (2012) observaram que gemas criopreservadas e encapsuladas não se regeneraram em meio rico em nutrientes, mas a vitrificação com DMSO e sacarose resultou em melhor regeneração. Santos et al. (2015) constataram que a imersão em PVS2 por 60min resultou em mais de 70% de recrescimento nos ápices criopreservados, e a pré-cultura aumentou as taxas de sobrevivência dos explantes.

Santana et al. (2022) avaliaram a viabilidade da criopreservação de gemas apicais de acessos de mangabeira utilizando a técnica de vitrificação por gotas. Ao comparar a porcentagem regeneração em escala com o tratamento controle (NL-), observou-se que o acesso AB apresentou 100% de explantes sobreviventes no 30º dia decultivo quando submetido a 30min de exposição à solução de PVS2 (30% (v/v) glicerol 15% (v/v) etileno glicol e 15% (v/v) DMSO). Este resultado sugere que a solução de PVS2 não foi tóxica ou deletéria para o acesso AB, pelo menos durante este período de exposição. O acesso Japaratinga (JA) apresentou uma menor taxa de explantes mortos e uma maior taxa de explantes sobreviventes em comparação com o acesso Terra Caída (TC) aos 30 e 60 dias de cultivo. No entanto, em relação ao número de explantes oxidados, o acesso JA demonstrou ser mais suscetível aos efeitos do estresse oxidativo durante o processo de vitrificação em gotas, registrando taxas de 67 e 80% aos 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente. Os autores destacam a necessidade de ajustes nas concentrações dos componentes do meio pós-cultura para alcançar maiores taxas de regeneração.

Não existem ainda resultados promissores para vitrificação em gotas em jenipapeiro. Elas podem ser secas até atingirem um nível de cerca de 10,0% de umidade, sem que haja uma redução significativa na taxa de germinação. Entretanto, quando a umidade das sementes é reduzida para níveis iguais ou inferiores a 11,7%, pode ocorrer aumento do tempo médio de germinação devido à dificuldade de absorção de água pela semente.

Estudos conduzidos por Santos e Salomão (2016) e Nascimento et al. (2020) alcançaram excelentes resultados para a criopreservação de sementes intactas de jenipapeiro com posterior regeneração a partir de eixos embrionários extraídos das mesmas. Souza *et al.* (2023) obtiveram resultados semelhantes com a alta recuperação de sementes de jenipapeiro após a criopreservação.

A tecnologia de encapsulamento ou sementes sintéticas, desenvolvida por Kitto e Janick (1982) foi baseada no uso de embriões somáticos, como sementes funcionais que consiste no envolvimento do material vegetal como ápices caulinares ou gemas laterais em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio. Febre e Dereuddre (1990) realizaram estudos com o intuito de unir a criopreservação à tecnologia de sementes sintéticas. Inicialmente, as sementes sintéticas foram propostas para embriões somáticos, que podem ser armazenados em curto prazo em câmaras frias e/ou semeados diretamente no solo (Figueiredo et al., 2018). Ao longo do tempo, outros protocolos surgiram, utilizando sementes sintéticas para a conservação e/ou preservação de explantes, como microbrotos, gemas axilares e ápices caulinares (Benelli, Carlo e Engelmann, 2013; Ahmed et al., 2015). A semente sintética quando semeada sobre condições *in vitro* e *ex vitro* possui a capacidade de se regenerar e formar uma nova planta, mantendo esse potencial mesmo após o armazenamento (Ara et al., 2000).

Esta tecnologia está se tornando uma ferramenta significativa em pesquisas relacionadas à multiplicação e à preservação de germoplasma por meio de cultivo *in vitro*. O processo de encapsulamento tem sido evidenciado como uma estratégia eficaz para a preservação de genótipos *in vitro*, especialmente por meio da técnica de criopreservação (Ferreira et al., 2007). Diversas abordagens foram elaboradas para aprimorar a criopreservação de sementes sintéticas, sendo notáveis o encapsulamento- vitrificação e o encapsulamento-desidratação (Wang et al., 2005; Pintos et al., 2008; Rai et al., 2009).

Em termos gerais, as pesquisas relacionadas ao encapsulamento frequentemente se concentram no uso de embriões somáticos como a fonte de explantes, enquanto são limitadas as investigações que exploram outros tipos de explantes como unidades encapsuláveis. O alginato de sódio é um produto extraído de algas marinhas marrons da classe Phaeophyceae, é o principal gel e tem sido amplamente adotado como o agente gelificante/encapsulante (Nogueira, 2010) preferido devido à sua solubilidade à temperatura ambiente, capacidade de formar um gel permeável com cloreto de cálcio, boas propriedades de gelificação, baixo custo, facilidade de manuseio e, igualmente importante, a ausência de toxicidade (Guedes et al., 2007; Nascimento et al., 2020).

A matriz de alginato de sódio que envolve os propágulos tem como principais vantagens à proteção dos embriões somáticos, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas. Esta técnica tem sido continuamente aprimorada de tal maneira que vários elementos podem ser incorporados à matriz de encapsulamento, entre eles, fitoreguladores, macro e micronutrientes, carboidratos e vitaminas (Guerra et al., 2001). O hidrogel alginato de sódio é considerado um dos principais géis utilizados para a realização da técnica de encapsulamento devido às suas propriedades gelificantes, fácil acesso, baixo custo, facilidade de manuseio e ausência de toxicidade. Tal resistência ou dureza pode acarretar, em alguns casos, a uma menor taxa de ruptura das cápsulas pelos explantes encapsulados (Mondo e Cicero, 2008), sendo necessária a adição de etapas que facilitem o rompimento, como a descomplexação utilizando o nitrato de potássio ( $KNO_3$ ), que possibilita o enfraquecimento facilitando a conversão em plântula (Onishi et al., 1994). Esse aspecto é um dos mais importantes da tecnologia de sementes sintéticas, sendo também fator limitante na prática dessa ferramenta.

Alguns trabalhos exploraram diferentes aspectos e aplicações da técnica de encapsulamento e criopreservação em jenipapo, tentando demonstrar sua eficácia na conservação e propagação de germoplasma vegetal e para formação de um protocolo de conservação das espécies. Sá et al. (2015) e Figueiredo et al. (2018) exploraram técnicas de preservação para ápices caulinares de jenipapeiro. Enquanto Sá et al. (2015) destacaram a eficácia da crioproteção e desidratação, especialmente através da aplicação em solução crioprotetora e desidratação em câmara de fluxo laminar, Figueiredo et al. (2018) ressaltaram a importância do armazenamento das unidades encapsuladas a 15 °C com pré-tratamento de sacarose para manter a integridade das cápsulas. Esses estudos sugerem estratégias promissoras para a preservação de ápices caulinares de jenipapeiro.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. C. **O ensino de biotecnologia na UFAM, campus Humaitá-AM**. 2020. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências e Humanidades) - Universidade Federal do Amazonas, Humaitá-AM, 2020.

AHMED, M. D. R.; ANIS, M.; AL-ETTA, H. A. Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. **Rendiconti Lincei**, p. 133–139, 2015.

ANDRADE, A. C. S. D. E. *et al.* Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 609–615, 2000.

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. p. 16.

AGRA, M. F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Semente sintética: perspectivas e limitações. **Current Science**, v. 78, p. 1438-1444, 2000.

ARMITAGE, W. J.; RICH, S. J. Vitrification of organized tissues. **Cryobiology**, v. 27, n. 5, p. 483-491, 1990.

ARNAO, M. T. G. *et al.* Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 92, p. 1-13, 2008.

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.

BURLE, M. L. **Conservação de recursos genéticos vegetais na Embrapa – histórico e perspectivas futuras**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019, 14p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 26)

BHUSHAN, D.; KUMAR, J. D.; DOEL, R. Dehydration-responsive reversible and irreversible changes in the extracellular matrix: comparative proteomics of chickpea genotypes with contrasting tolerance. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 2027-2046, 2011.

CARLO, A.; LAMBARDI, M. Cryopreservation of citrus germplasm. **The Role of Biotechnology**, v. 5, p. 169-170, 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento**. Biotecnologia, 22p. (Embrapa Algodão. Documentos, 115), 2003.

CARVALHO, T. C. D. *et al.* Criopreservação de embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) contendo tecido de reserva. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 959-973, 2021.

CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do. Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, p. 53-56, 2000.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. p. 980.

COPATTI, A. S. **Criopreservação de cultivares de amoreira-preta**. 2021. 123 f.: il. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2021.

CHMIELARZ, P. *et al.* Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1405-1414, 2011.

CHUA, S. P.; NORMAH, M. N. Effect of preculture, PVS2 and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan*-like shoot tips after cryopreservation by vitrification. **Cryoletters**, v. 32, p. 506-515, 2011.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense: Rubiaceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2005. p. 493.

DJERASSI, C.; GRAY, J. D.; KINCL, F. A. Naturally occurring oxygen heterocycles: isolation and characterization of genipin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 25, p. 2174-2177, 1960.

ERBANO, M.; DUARTE, M. R. Leaf and stem morpho-anatomy of *Genipa americana* L., Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 825-832, 2010.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. In: THORPE, T.; YEUNG, E. (eds) Plant Embryo Culture. **Methods in Molecular Biology**, v. 710, p. 155-184, 2011.

ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

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.

FEBRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of solanum shoot-tips. **Cryoletters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

FERREIRA, H. C. *et al.* Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 14, n. 7-8, p. 473-478, 2007.

FIGUEIREDO, J. R. M. *et al.* Conservation of *Genipa americana*: encapsulation and slow growth techniques. **Revista Eletrônica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, p. 9, 2018.

FONSECA, F. K. P. *et al.* Efeito do balance hormonal na organogênese e multiplicação de brotos de mangabeira *Hancomia speciosa* Gomes *in vitro*. In: Simpósio Brasileiro sobre a Cultura da Mangaba, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CDROM. Seção Resumos Expandidos.

GARWOOD, N. C. Tropical soil seed banks: a review. In: LECK, M.; PARKER, V.; SIMPSON, R. (Ed.). **Ecology of soil seed banks**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 149-209.

GAO, Y. *et al.* Proline-conditioning and chemically-programmed ice nucleation protects spheroids during cryopreservation. **Chemical Communications**, v. 59, n. 59, p.9086-9089, 2023.

GEORGE, E. F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E. F. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**: Edington: Exegetics, 1993. p. 37-66.

GOMES, R. R. **Conservação "in situ" e "ex situ" de *Syagrus glaucescens*: uma espécie endêmica e ameaçada**. 2020. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG, 2020.

GUERRA, M. P. *et al.* Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

GUEDES R. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Revista Árvore**, v. 31, p. 1005-1011, 2007.

GUARNACCIA, R. *et al.* Acid, na iridoid glucoside from *Genipa americana*. **Tetrahedron Lett**, v. 50, p. 5125-5127, 1972.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. *et al.* **Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) ápices**, 2020.

JAISWAL, A. N.; VAGGA, A. Cryopreservation: a review article. **Cureus**, v. 14, n. 11, p. e31564, 2022.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. [s.l: s.n.]. p. 221, 2002.

JENSEN, S. R. Iridoids in *Rothmannia globosa*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1761-1765, 1983.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant systematics**. Sunderland: Sinauer, 2008. p. 576.

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

KILSON P. L. *et al.* Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.

LAMEIRA, O. A. *et al.* **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p.

LEDO, A. S. *et al.* **Criopreservação por vitrificação em gotas de plúmulas de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui**. In: Embrapa Tabuleiros Costeiros. Aracaju: [s.n.], p. 11, 2020.

LIMA, F. **Criopreservação de vegetais é novidade na EMBRAPA**. Tecnologia permite conservação de meristemas, embriões, sementes ou outros tecidos da planta por tempo indeterminado. Embrapa Clima Temperado, 2014.

LOBATO, G. M. **Recursos genéticos e melhoramento da mangueira no Brasil**. 2023. 38 f. Monografia (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha-MA, 2023.

MARTINKOVÁ, Z.; HONEK, A. The effect of cryopreservation on germination of dandelion seeds. **Plant Protection Science**, v. 43, p. 63-67, 2007.

MALSCHITZKY, S. A. *et al.* Resposta da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) à vitrificação em gotas. In: Seminário de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 10., 2021. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. [s.l.: s.n.], 2021.

MATOS, F. J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1999. 253 p.

MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Aspectos sobre a tecnologia de sementes sintéticas. **Informativo Abrates**, v. 18, n. 1, 2, 3, p. 23-29, 2008.

MOURA, N. F. *et al.* Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, p. 473-481, 2011.

MOREIRA, S. O.; SEIDEL, M. C.; GODINHO, T. O. Propriedades físico-químicas de frutas nativas do Brasil e promoção da conservação pelo uso. In: SIMPÓSIO INCAPER PESQUISA. **Anais ...** Editores Vitória, ES: Incaper, p. 17, 2023.

MORAIS, T. P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOSA, K. A. *et al.* Insights into cryopreservation, recovery and genetic stability of medicinal plant tissues. **Fitoterapia**, v. 169, n. 105555, p. 1-11, 2023.

NASCIMENTO, R. S. M.; CARDOSO, J. A.; COCOZZA, F. D. M. Physical and physicochemical characterization of 'mangabeira' fruits in Western Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 856-860, 2014.

NASCIMENTO, C. M. do *et al.* Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2020.

VIEIRA NETO, R. D. V. *et al.* **Sistema de produção da mangaba para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. v. 2, 2007.

NISHIZAWA, S. *et al.* Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 67-73, 1993.

NOGUEIRA, G. F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira**. 2010. 72p.:il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras-MG, 2010.

NORMAH, M. N.; SULONG, N.; REED, B. M. Criopreservação de pontas de brotos de espécies recalcitrantes e tropicais: avanços e estratégias. **Criobiologia**, v. 87, p. 1-14, 2019.

OLIVEIRA, A. C. A. *et al.* Criopreservação de espécies de cana-de-açúcar por vitrificação de gotículas. **Revista Foco (Interdisciplinary Studies Journal)**, v. 8, p. e2792, 2023.

OLIVEIRA, A. C. A. *et al.* Efeito da solução de vitrificação PVS2 em ápices caulinares de jenipapeiro. *In*: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, **Anais ...** [s.l: s.n.], Aracaju, 2016.

OLIVEIRA, A. C. A. *et al.* Efeito do tempo de dessecação na umidade de eixos embrionários de jenipapeiro. *In*: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 7., **Anais** 2016. ESALQ-USP, Piracicaba- SP, 2016.

OLIVEIRA, G. V. D.; RODRIGUES, P. D.; AIUB, P. B. Importância e métodos de conservação do axalote (*Ambystoma mexicanum*) *in situ* e *ex situ*: revisão de literatura. *In*: Encontro Científico de Produção Científica de Medicina Veterinária, 24., **Anais** 2023.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, n. 2, p. 137-145, 1994.

OZUDOGU, E.; AYLIN, E.; ERGUN, K. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: Comparison of three vitrification-based methods. **Cryoletters**, v. 33, p.363-375, 2012.

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.

PETTINELLI, J. de A. **Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2014.

PEDRAL, D. F. D. O. *et al.* Aplicações de técnicas para conservação a longo prazo de recursos genéticos de mangabeira. *In: Seminário de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros*, 10, **Anais...** Aracaju- SE, 2021.

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

PEREIRA, A. B. D. *et al.* Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography B**, v. 887, n. 1, p. 133-137, 2012.

PINTOS, B. *et al.* Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 217-225, 2008.

PRUDENTE, R. M. Jenipapo (*Genipa americana* L.). *In: VIEIRA NETO, R. D.(ed). Fruteiras potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas.* Aracaju: EmbrapaCPATC/Emdagro, 2002. p. 88-114.

RAYOL, B. P.; RAYOL, Y. A. Quintais urbanos amazônicos: refúgios da agrobiodiversidade nas cidades. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 15, n. 3, p. 1-10, 2021.

RAI, M. K. *et al.* The encapsulation technology in fruit plants—a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 6, p. 671-679, 2009.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** 1 ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2001. p. 405.

ROCHA, M. do S. *et al.* Crioconservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental/Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering**, v. 13, n. 3, p. 312–318, 2009.

ROVARIS, B. C. **Jenipapo (*Genipa americana* L.) como corante azul natural.** TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Engenharia de Alimentos, p. 44, 2020.

RUZZA, D. A. C. *et al.* Etnobotânica do jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae) entre agricultores no município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61161-61184, 2020.

SANTANA, F. V. *et al.* Effects of droplet vitrification on the regeneration of apical shoot tips of mangabeira accessions. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, p. e38111738734, 2022.

SALINAS, N. S. C. Extrativismo e processos de institucionalização: uma análise da experiência das catadoras de mangaba em Sergipe. **Economic Analysis of Law Review**, v. 11, n. 1, p. 181-193, 2020.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SÁ, F. P. D. *et al.* Encapsulation, cryoprotection and dehydration in the regenerative capacity of shoot apices of *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1939-1945, 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.

SANTOS, I. R. I.; SALOMAO, A. N. **Guia prático de criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2023. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 385).

SANTOS, P. A. A. *et al.* Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long term storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 289-296, 2015.

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.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. *In*: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: A practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 33–57.

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.

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

SILVA, F. S. *et al.* Análise sensorial da geleia mix das polpas de cagaita e mangaba. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 2021.

SILVA, A. V. C. da; LEDO, A. da S.; SILVA JUNIOR, J. F. da. **Descritores para o jenipapeiro** (*Genipa americana* L.), p. 63, 2020.

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

SILVA JÚNIOR, J. F. da; RODRIGUES, R. F. A.; MOTA, D. M. da. A produção de mangaba a partir do cultivo em Sergipe. **Revista AEASE**, n. 26, 2023.

SOUZA, R. R. D. *et al.* Cryopreservation of *Genipa americana* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 54, e20228531, p. 1-7, 2023.

SOUZA, A. C. de *et al.* Steps of cryopreservation of coffee seeds: physiological responses and antioxidant systems. **Ciência Rural**, v. 54, n. 2, p. 1-12, 2024.

TRESENA, N. L. *et al.* Qualidade fisiológica da semente de ipê rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas à criopreservação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, p. 87-93, 2009.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. p. 128.

VALDÉS, Y.C. *et al.* Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1861, 2021.

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

WANG, Q. *et al.* Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 280-288, 2005.

#### 4. ARTIGO 1

**Artigo publicado em 08/03/24:**

ARAÚJO, A. B. N.; OLIVEIRA, A. C. A.; Graça, G. A.; SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S. Cryopreservation techniques in genipap and mangaba: challengers and perspectives. **Observatorio De La Economía Latinoamericana**, v. 22, p. e3675, 2024 – Qualis A4

#### **CRYOPRESERVATION TECHNIQUES IN GENIPAP AND MANGABA: CHALLENGERS AND PERSPECTIVES**

##### **ABSTRACT**

The genipap (*Genipa americana* L.) is a native species of Brazil, found in various regions of the country, from the North to the South, including Sergipe. On the other hand, the mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), another Brazilian tropical plant, is recognized for its fruits rich in iron and vitamin C, widely exploited by the pulp, juice, and ice cream industry. However, it faces threats due to urban development in the coastal region. To preserve these species, techniques such as cryopreservation are fundamental. This approach, which maintains plant tissues at ultra-low temperatures, allows the conservation of genetic material indefinitely, contributing to the maintenance of biological diversity. Encapsulation technology, which involves enclosing plant material in a specific matrix, is also promising in this context, offering a long-term preservation method for plant explants and embryos. These methods represent significant advances in the field of plant species conservation, providing effective strategies to ensure the survival of these plants in the face of environmental challenges and human development. The objective of this review is to address some studies involving cryopreservation techniques for genipap and mangaba species. Through cryopreservation techniques, we can achieve *ex situ* conservation for the germplasm bank as well as for plant regeneration and reforestation of areas. It is evident that there is a need to increase studies on the conservation of both species.

**Keywords:** *Genipa americana* L, *Hancornia speciosa* Gomes, cryopreservation, encapsulation, *ex situ* conservation.

#### 4.1 INTRODUCTION

*Genipa americana* L., commonly known in Brazil as jenipapeiro or jenipapo (Ruzza et al., 2020), stands out as a native but not endemic species of Brazil and occurs in the North, Northeast, Midwest, Southeast, and South regions of Brazil (Gomes, 2015), in various Brazilian states, including Sergipe, which sparks the need for studies, as it has been used in restoration programs for degraded areas by the Restoration Group of the Federal University of Sergipe (Santos et al., 2011). It has a tree habit, which can reach up to 25 m in height, and is distributed from Amapá to São Paulo and Mato Grosso, being cultivated in orchards throughout the country, including the southern states (Corrêa, 1984).

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) is a tropical fruit plant native to Brazil and found in various regions of the country, from the Coastal Tablelands and Low Coastal Plain of the Northeast to the cerrados of the Midwest, North, and Southeast regions. Fonseca *et al.* (2003) classified mangabeira as belonging to the Apocynaceae family. It is a latex-producing plant, its fruits are rich in iron and also a good source of vitamin C, presenting an incomparable flavor and aroma, being the main product exploited by pulp, juice, and ice cream industries. The fact that mangabeira is on the list of endangered species due to the increasing development of the construction industry in the coastal region makes cryopreservation techniques an ally for the preservation of this species (Sartor et al., 2012).

Its basic definition is the aseptic cultivation of any living part of the plant (explants) consisting of tissue fractions, organs, or even cells in suspension in a synthetic culture medium (nutrients, growth regulators, etc.) under controlled conditions of temperature, humidity, and luminosity, to generate a new plant (Lameira et al., 2000).

Cryopreservation of plant genetic materials enables the conservation of meristems, embryos, seeds, and other plant tissues for an indefinite period. This laboratory method is pioneering in the southern region for the conservation of germplasm at ultra-low temperatures (-196 °C) within liquid nitrogen tanks. This technique halts the plant's growth and subsequent multiplication, enabling the formation of a germplasm bank in a reduced space (Sartor et al., 2012). The exposure of plants to nitrogen, in addition to conservation, can eliminate viral particles from plant tissues, a technique called cryotherapy (Lima, 2014).

It can be used for all types of explants, such as: meristems, cell suspensions, embryos (somatic, zygotic, or nucellar), and protoplasts. Generally, smaller structures are more suitable for freezing, as dehydration and freezing occur more quickly and uniformly in smaller structures. Various techniques are being studied in search of better storage conditions, with the main one being based on reducing metabolism, either by removing water and/or lowering temperature (Kohoma et al., 2006). According to Towill (2002), the efficiency of the cryopreservation process will depend on the results obtained in each of the following stages: preparation of the material, cryopreservation, and thawing of the material. The major challenge for cryopreservation is to freeze without the formation of ice crystals inside the cells.

There are different cryopreservation techniques, and the choice among them depends on the species and explant to be cryopreserved (Panis e Lambardi, 2005). One of the recently developed cryopreservation techniques is droplet vitrification, which involves pretreating the explants with vitrification solution before they are placed on strips of aluminum foil with a drop of Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) and then immersed in liquid nitrogen (Engelmann, 2011).

The encapsulation technology or synthetic seeds, developed by Kitto e Janick (1982), was based on the use of somatic embryos as functional seeds, which consists of

encapsulating plant material such as shoot apices or lateral buds in a matrix of sodium alginate and calcium chloride. Febre e Dereuddre (1990) conducted studies with the aim of combining cryopreservation with synthetic seed technology. Initially, synthetic seeds were proposed for somatic embryos, which can be stored short-term in cold chambers and/or sown directly in soil (Figueiredo et al., 2018; Silveira e Sibov, 2019). Over time, other protocols have emerged, using synthetic seeds for the conservation and/or preservation of explants, such as microshoots, axillary buds, and shoot apices (Benelli et al., 2013; Ahmed et al., 2015). When sown under *in vitro* and *ex vitro* conditions, synthetic seeds have the ability to regenerate and form a new plant, maintaining this potential even after storage (Ara et al., 2000).

## 4.2 CRYOPRESERVATION TECHNIQUES

There are several cryopreservation techniques available, and the choice among them depends on the species and type of explant to be preserved (Panis e Lambardi, 2005). One of these techniques is droplet vitrification, which involves a series of important steps including pretreatment, preconditioning, preculture, osmoprotection, dehydration, cooling, warming, and protection (Sakai et al., 2008). The application of a vitrification solution (PVS - Plant Vitrification Solution) to explants is one of the most significant advancements in this field and involves the use of a mixture of cryoprotectants (Engelmann, 2011). The most common solutions for plant species are PVS2, composed of 30% glycerol, 15% ethylene glycol, 15% DMSO, and 0.4 M sucrose, and PVS3, composed of 50% glycerol and 50% sucrose, optionally in liquid MS medium (Nishizawa et al., 1993).

Vitrification is a physical process that occurs at extremely low temperatures, where cellular content freezes due to the presence of a highly concentrated solution of cryoprotectants. During this process, cellular content transitions from a liquid to a vitreous state, without the formation of ice crystals. This phenomenon occurs because, during freezing, solutes inside cells concentrate, maintaining osmotic balance with the external environment and protecting tissue from excessive dehydration, thereby preserving cellular volume. Additionally, freezing leads to a metabolic block, preventing molecular diffusion inside and outside cells and avoiding the formation of ice crystals (Armitage e Rich, 1990).

This transition to the vitrified state allows the material to tolerate rapid temperature variations during cooling and warming, maintaining cellular stability during storage in liquid nitrogen. This stability is crucial to prevent physical and chemical alterations during the dehydration process (Arnão et al., 2008). Vitrification techniques are derived from this natural process and are achieved by dehydrating tissues through artificial exposure to concentrated solutions of chemical cryoprotectants during pretreatment (Engelmann, 2011 Souza et al., 2023). Currently, different vitrification protocols are being developed, varying in the composition of cryoprotectant solutions and exposure time, adapting to the characteristics of each species.

This technology encapsulation is becoming an important tool in studies on multiplication and preservation of genetic material through *in vitro* cultivation. The encapsulation process has proven to be an effective strategy for maintaining genotypes under *in vitro* conditions, especially through cryopreservation (Perreira et al., 2008). Several approaches have been developed to improve the preservation of synthetic seeds, with notable mention of encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration, as highlighted by renowned researchers (Wang et al., 2005; Pintos et al., 2008; Rai et al., 2009). Generally, research in this area focuses on the use of somatic embryos as a

source of explants, while studies exploring other types of explants as encapsulable units are still limited.

Sodium alginate, derived from seaweed, has been widely used as an encapsulating agent due to its solubility at room temperature, ability to form a permeable gel, and characteristics of low cost and easy handling (Nogueira, 2010). The alginate matrix surrounding the propagules provides protection to somatic embryos, facilitates storage, transportation, and conversion into plants. This technique has been continuously improved to allow the incorporation of various elements into the encapsulation matrix, including phytohormones, nutrients, and vitamins (Guerra et al., 2001). However, the resistance of the alginate hydrogel can hinder the rupture of capsules by encapsulated explants, requiring additional steps to facilitate this process, such as decomplexation with potassium nitrate (Mondo e Cicero, 2008). These aspects are crucial for the development and effective application of synthetic seed technology.

Recently developed adaptive techniques, such as encapsulation/vitrification or encapsulation/dehydration, involve enclosing the explant in a sodium alginate capsule before dehydration. These techniques allow the use of higher concentrations of cryoprotectants during preculture, resulting in greater tolerance to dehydration. The sodium alginate capsule provides protection and supplies nutrients during all pretreatment stages (Pereira et al., 2008; Nascimento et al., 2020).

#### **4.3 MAIN RESULTS PUBLISHED**

There are few existing studies published on the long-term conservation of genipap and mangaba species. Sartor et al. (2012) aimed to cryopreserve apical and lateral buds of mangaba using vitrification and encapsulation-dehydration techniques. In the vitrification method, concentrations of sucrose (0, 0.25, 0.5 and 0.75 M) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (0, 5, 10 and 15%) were used to aid in the dehydration of the material, followed by freezing the buds in liquid nitrogen for five days and then cultivating them in a regeneration medium. For the encapsulation-dehydration technique, capsules were formed using solutions of alginate gel (5%) and calcium chloride (0.2 M), with dehydration periods of 0, 1, 2, and 3 hours in a laminar flow chamber. It was observed that encapsulated buds frozen in liquid nitrogen did not regenerate when sub-cultured in nutrient medium; the buds that survived vitrification were those subjected to DMSO and sucrose and subsequently cultivated in Wood Plant Medium (WPM), showing better regeneration for concentrations of 5% DMSO and 0.5 M sucrose, respectively.

Santana et al. (2022) evaluated the viability of cryopreserving apical buds of mangaba using the droplet vitrification technique. In Experiment I, when comparing the regeneration percentage with the control treatment (without cryopreservation NL-), it was observed that the AB accession presented 100% surviving explants on the 30<sup>th</sup> day of cultivation when subjected to 30 min of exposure to PVS2 solution (30% (v/v) glycerol, 15% (v/v) ethylene glycol, and 15% (v/v) DMSO). This result suggests that the PVS2 solution was not toxic or deleterious to the AB accession, at least during this exposure period. In Experiment II, it was observed that the Japaratinga (JA) accession had a lower rate of dead explants and a higher rate of surviving explants compared to the Terra Caída (TC) accession on days 30 and 60 of cultivation. However, regarding the number of oxidized explants, the JA accession proved to be more susceptible to the effects of oxidative stress during the droplet vitrification process, registering rates of 67% and 80% on days 30 and 60 of cultivation, respectively. The authors highlight the need for adjustments in the concentrations of post-culture medium components to achieve higher regeneration rates.

Santos et al. (2015) performed cryopreservation techniques in mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) to establish a protocol for long-term storage. Their main objective was to evaluate the efficiency of droplet vitrification and vitrification in cryopreserving shoot apices of mangaba. The regrowth of mangaba apices cryopreserved by the droplet vitrification technique was evaluated using different treatment times with the vitrification solution (15, 30, 45, and 60 min.) and subjected to different pre-culture periods (absence, 24, or 48 h) in a medium with 0.3 M sucrose before cryopreservation. In addition to this technique, the effect of the classic vitrification technique using four exposure times to the vitrification solution (15, 30, 45, and 60 min.) was evaluated. Significant differences were observed in the exposure time for both vitrification and droplet vitrification techniques. For both techniques, the 60-minute immersion time promoted regrowth of over 70% in the cryopreserved apices. Pre-culture promoted increased survival of cryopreserved explants. The cryopreservation techniques of shoot apices by droplet vitrification and vitrification were shown to be viable for prolonged mangaba conservation.

Sá et al. (2015) aimed to evaluate the effect of different dehydration times in a laminar flow chamber and immersion times in a cryoprotective solution (MS+0.5 M sucrose) on the regenerative capacity of shoot apices of *Genipa americana* L. for the establishment of future cryopreservation protocols. Shoot apices were obtained from seedlings, Oiteiros accession, germinated and cultivated *in vitro*. The explants were subjected to encapsulation and different immersion times in a cryoprotective solution and dehydration times in a laminar flow chamber. Significant effects of immersion times in the cryoprotective solution (MS+0.5 M sucrose) and dehydration times in a laminar flow chamber on the moisture content of shoot apices were observed. Immersion for 24 and 48 h in the cryoprotective solution reduced the moisture content by 23.31% and 28.47%, respectively, compared to the initial moisture content of the capsules (66.68%). Encapsulated shoot apices, regardless of immersion time in the cryoprotective solution, showed higher moisture content (47.96%). High regeneration rates of encapsulated shoot apices, immersed in cryoprotective solutions (0.5 M sucrose) and dehydrated in a laminar flow chamber for 0, 2, and 4 hours, reaching 91%, 67%, 100%, and 91.67% regeneration, respectively, were observed. Immersion for 24 hours in the cryoprotective solution (MS+0.5 M sucrose) and dehydration for two hours in a laminar flow chamber showed potential for use in future encapsulation-dehydration cryopreservation studies.

Studies conducted by Santos e Salomão (2016) aimed to evaluate the effect of dehydration and storage in liquid nitrogen (-196 °C) on the viability of zygotic embryos of *G. americana* L., as a step towards developing a long-term conservation protocol for this species. Excised embryonic axes from seeds of *Genipa americana* L. dehydrated to different water contents were successfully cryopreserved by quickly immersing seed samples directly in liquid nitrogen. Control and cryopreserved embryonic axes were excised and cultured in WPM culture medium to assess viability. All control embryonic axes (LN-) excised from fully hydrated seeds (43.89% moisture) germinated after 21 days of *in vitro* cultivation. These high germination percentages persisted even after irrigation. When the moisture content of the seeds was as low as 6.79%, germination percentages of 93%, 96%, and 93% were observed after freezing in liquid nitrogen for embryonic axes excised from seeds dehydrated to 13.26%, 9.57%, and 6.79% moisture, respectively.

Figueiredo et al. (2018) aimed to attempt genipap conservation using encapsulable unit storage and slow growth techniques. They used nodal segments of the *Genipa americana* plant and subjected them to different storage methods, including

encapsulation and slow growth, as part of a conservation study. In the case of encapsulation, the effects of different concentrations of sodium alginate (3% and 4%), pre-treatment with sucrose solutions (0, 0.25, and 0.50 M), and storage temperatures (8 °C and 15 °C) over 30 days, with subsequent evaluation of capsule integrity after 50 days, were investigated. For slow growth, different concentrations of sucrose (30, 45, and 60 g.L<sup>-1</sup>) and storage temperatures (8 °C and 15 °C) after 90 and 180 days, with analysis of survival, regeneration, aerial part length, number of shoots, and leaves were tested. Only encapsulated units stored at 15 °C were able to survive, with better capsule integrity observed at this temperature with pre-treatment of 0 M sucrose. In the case of slow growth, the 8 °C temperature did not allow explant survival. Consequently, the best results after 180 days were obtained at 15 °C with the addition of 60 g.L<sup>-1</sup> sucrose to the culture medium. Therefore, the experiments indicate the feasibility of species storage using these techniques.

Nascimento et al. (2020) aimed to investigate the impact of dehydration duration on the regeneration capacity of embryonic axes of two jenipapo accessions (Umbaúba and Núcleo Bandeirante). Seeds were subjected to different dehydration periods in a polycarbonate box with silica gel, ranging from 0, 12, 16, and 20 h, at room temperature. After each period, the seed moisture content was determined. Subsequently, the seeds were inoculated on germination medium, and samples were prepared in cryotubes and immersed in liquid nitrogen at -196 °C. Dehydration using silica gel effectively reduced the moisture content in both accessions. Umbaúba accession exhibited 100% germination in all dehydration treatments prior to cryopreservation, while the Núcleo Bandeirante accession proved to be more sensitive, with only 10% germination after 20 h of dehydration. A reduction in growth variables of the Umbaúba accession was observed with increased dehydration time, while the treatments did not affect the growth variables of the Núcleo Bandeirante accession. Despite the changes observed in the ultrastructure of the embryonic axes, dehydration did not have a significant impact on the percentage of regeneration of cryopreserved accessions.

There are currently no results for droplet vitrification in genipap, due to its seeds having moderate tolerance to dehydration during storage. They can be dried to a level of about 10.0% moisture without a significant reduction in germination rate. However, when the moisture content of genipap seeds is reduced to levels equal to or less than 11.7%, this can increase the average germination time due to the difficulty of water absorption by the seed. Furthermore, freezing genipap seeds, regardless of their moisture content, compromises germination capacity and may induce or exacerbate seed dormancy. However, there is little information on genipap seed tolerance to freezing (Santos e Salomão, 2016), and there is currently no well-established cryopreservation protocol for this species using seeds as material (Santos e Salomão, 2023).

**Table 1:** Main cryopreservation technique articles published with genipap and mangaba.

TITLE	SPECIE	EXPLANT	TECHNIQUE (S)	RESULTS	REFERENCES
Techniques for cryopreservation of mangaba buds	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Apical and lateral buds	Cryopreservation	The highest regeneration rates in NL were observed with concentrations of 5% DMSO and 0.5 M sucrose	Sartor et al. (2012)
Encapsulation, cryoprotection, and dehydration on the regenerative capacity of shoot tips of <i>Genipa americana</i>	<i>Genipa americana</i> L.	Shoot tips	Encapsulation, Cryoprotection, and Dehydration."	Immersion for 24 and 48 hours in the cryoprotective solution (MS medium + 0.5 M sucrose) reduced capsule moisture to 23.31% and 28.47%, respectively. Regeneration rates in NL were high for encapsulated shoot tips, ranging from 91% to 100%	Sá et al. (2015)
Cryopreservation of the mangaba tree ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes): a protocol for long-term storage.	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Shoot tips	Cryopreservation	The immersion time of 60 minutes for vitrification techniques resulted in a growth resumption of over 70% in cryopreserved shoot tips	Santos et al. (2015)
Viability assessment of <i>Genipa americana</i> L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using <i>in vitro</i> culture.	<i>Genipa americana</i> L.	Embryonic axes	Cryopreservation	High germination rates (93%, 96%, and 93%) were observed for the embryonic axes after NL from dehydrated seeds, with moisture content of	Santos e Salomão (2016)

					13.26%, 9.57%, and 6.79%, respectively	
Conservation of <i>Genipa americana</i> : encapsulation and slow growth techniques	<i>Genipa americana</i> L.	Nodal segments	Encapsulation and Dehydration.		After 180 days, the best results were observed at 15 °C with the addition of 60 g L <sup>-1</sup> of sucrose to the culture medium	Figueiredo et al. (2018)
Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions	<i>Genipa americana</i> L.	Embryonic axes	Dehydration duration on the regeneration capacity		The Umbaúba accession showed high germination (100%), while the Núcleo Bandeirante accession had low germination (10%) after 20 hours of dehydration. Umbaúba had its growth affected by dehydration, unlike Núcleo Bandeirante	Nascimento et al. (2020)
Effects of droplet vitrification on the regeneration of apical tips of mangaba accessions	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Shoot tips	Cryopreservation		The PVS <sub>2</sub> solution did not harm the AB accession.  The JA accession had more surviving explants than the TC accession on days 30 and 60 of culture. However, the JA accession was more affected by oxidative stress, showing higher rates of oxidized explants on the same days	Santana et al. (2022)

#### **4.4 CONCLUSION**

Jenipapo and mangaba, due to their significant socioeconomic importance, primarily in the utilization of fruits for making sweets and juices, have been increasingly studied to enable the storage of different accessions to ensure the species' survival in the event of any disaster in field Gene Banks. In light of the studies conducted, we realize how important the use of cryopreservation techniques is to protect and keep plant species like jenipapo and mangaba under security conservation.

These techniques not only help us conserve the genetic diversity of plants but can also be a lifeline for species at risk of disappearing, such as the mangaba. However, the results also remind us that there is still much to learn and refine in these techniques. Each plant has its own needs and peculiarities, and it is essential to adjust the methods according to these characteristics to ensure they survive and can regenerate properly after the cryopreservation process.

These studies show us that there is hope and potential in cryopreservation techniques, but they also highlight the ongoing importance of research and improvement in these techniques to ensure that we can effectively protect our precious plants and all the genetic wealth they carry.

#### 4.5 REFERENCES

- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seeds: perspectives and limitations. **Current Science**, v. 78, p. 1438-1444, 2000.
- ARMITAGE, W. J.; RICH, S. J. Vitrification of organized tissues. **Cryobiology**, v. 27, p. 483-491, 1990.
- ARNAO, M.T.G.; PANTA, A.; ROCA, W.M.; ESCOBAR, R.H.; ENGELMANN, F. Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 92, p.1-13, 2008.
- AHMED, M. D. R.; ANIS, M.; AL-ETTA, H. A. Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. **Rendiconti Lincei**, v. 26, n. 2, p. 133-139, 2015.
- 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.
- CORRÊA, P. M. **Dictionary of useful plants of Brazil and cultivated exotics**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.
- 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.
- FEBRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of solanum shoot-tips. **Cryoletters**, v. 11, p. 413-426, 1990.
- FIGUEIREDO, J. R. M.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; DA SILVA; D. P. C.; MESQUITA, R.; DE FARIAS, C. V. N.; REIS, M. V. Conservation of *Genipa americana*: encapsulation and slow growth techniques. **Revista Eletrônica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16,n. 1, 2018.
- FONSECA, F. K. P.; LEMOS, E. E.; OLIVEIRA, G. L.; ALENCAR, L. M. C. Effect of hormonal balance on organogenesis and multiplication of shoots of *Hancomia speciosa* Gomes in vitro. *In: Brazilian Symposium on the Cultivation of Mangaba, 2003, Aracaju. Annals... Aracaju: Embrapa Coastal Tablelands, 2003. CD-ROM. Expanded Abstracts Section.*
- GOMES, M. Genipa Flora and Fungi of Brazil. Rio de Janeiro. **Botanical Garden**, 2015. Available at: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14045>. Accessed on: Feb 13, 2023.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DU CROQUET, P. H. J.; NODARI, R.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic hock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.
- KITTO, S. K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488, 1982.
- KOHOMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C. Drying and storage of seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 72-78, abr. 2006.

- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. **Tissue culture (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000.
- LIMA, F. **Cryopreservation of plants is a novelty at EMBRAPA**. Technology allows for the conservation of meristems, embryos, seeds, or other plant tissues indefinitely. Embrapa Temperate Climate, 2014.
- MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Aspects of synthetic seed technology. **Informativo Abrates**, v. 18, n. 1, 2, 3, p. 23-29, 2008.
- NASCIMENTO, C. M. do; OLIVEIRA, L. A. R. DE; SILVA, A. V. C. da; CASTRO, E. M. DE; LÉDO, A. da S. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, n. 2, 2020.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 67-73, 1993.
- NOGUEIRA, G. F. **Cryopreservation and in vitro synthetic seed production of mangaba**. 2010. 72p.:il. Dissertation (Master's) – Federal University of Lavras, UFLA, UFLA, Minas Gerais, 2010.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. *In: Electronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture*, 13., 2005, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2005.
- PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. D. S.; COSTA, F. H. D. S.; SCHMITZ, G. C. B. Composition of the encapsulation matrix in the formation and conversion of synthetic seeds of long pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 93-96, 2008.
- PINTOS, B.; BUENO, M. A.; CUENCA, B.; MANZANERA, J. A. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 217-225, 2008.
- 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, p. 6, p. 671-679, 2009.
- RUZZA, D. A. C.; ROSSI, A. A. B.; FERNANDES, J. M.; DE PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; BISPO, R. B.; MARTINS, K. C. Ethnobotany of jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae) among farmers in the municipality of Carlinda, Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61161-61184, 2020.
- SÁ, F. P.; SOUZA, V. F. D.; SILVA, V. C.; LÉDO, S. A. Encapsulation, cryoprotection, and dehydration in the regenerative capacity of caulinar apices of *Genipa americana*. **Rural Science**, v. 45, n. 11, p. 1939-1945, 2015.
- SARTOR, F. R.; MORAES, A. M. de; ALMEIDA, F. A. C. Techniques for cryopreservation of mangaba buds. **Agrotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.
- SANTANA, F. V.; OLIVEIRA, L. A. R. de; SANTOS, P. A. A.; SILVA, A. V. C. da; LEDO, A. da S. Effects of droplet vitrification on the regeneration of apical tips of mangaba accessions. **Investigation, Society and Development**, v. 11, n. 17, e38111738734, 2022.

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.

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 long-term storage. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 37, p. 289-296, 2015.

SANTOS, A. R. F. dos; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Water restriction in *Genipa* seeds (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, v. 35, n. 2, Apr. 2011.

SANTOS, I. R. I.; SALOMAO, A. N. **Practical guide to cryopreservation: techniques applied to the conservation of plant germplasm**. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Documents, 385, 2023.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. *In*: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: A Practical Guide**. New York, NY: Springer, 2008. p. 33–57.

SOUZA, A. C. D.; COSTA, M. C.; FIGUEIREDO, M. A. D.; PEREIRA, C. C.; COELHO, S. V. B.; VILELA, A. L. O.; ROSA, S. D. V. F. D. Stages of coffee seed cryopreservation: physiological and antioxidant system responses. **Ciência Rural**, 54, e20220480, 2023.

SILVEIRA, A. A. C.; SIBOV, S. T. Encapsulation-dehydration of *Eugenia dysenterica* caulinar apices. **Multi-Science Journal**, v. 2, n. 2, p. 39-41, 2019.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. *In*: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. **Cryopreservation of plant germplasm II**. Berlin: Springer, **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 50, p. 4-21, 2002.

WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, JP. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 280-288, 2005.

## 5. ARTIGO 2

### **EFEITO DA SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO PVS2 NA REGENERAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE MANGABEIRA**

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Caatinga

#### **RESUMO**

A *Hancornia speciosa* é uma árvore nativa do Brasil valorizada por seus frutos e propriedades medicinais. Este estudo teve como objetivo avaliar como a mangabeira Água Boa responde à técnica de vitrificação por gotas, visando estabelecer um protocolo de conservação *ex situ* complementar para o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O experimento foi realizado em um delineamento casualizado, com três tratamentos que variaram os tempos de exposição à solução PVS2 (10, 20 e 30 minutos), e sete repetições por tratamento. O grupo controle incluiu ápices caulinares não expostos ao nitrogênio líquido, apenas imersos em PVS2. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas na regeneração dos ápices não expostos ao nitrogênio líquido, independentemente do tempo de exposição à solução PVS2, sugerindo um padrão linear negativo. Para os ápices expostos ao PVS2 e criopreservados em nitrogênio líquido, não foi observado um efeito significativo na regeneração após 30 dias de cultivo, mas houve uma redução na viabilidade com o aumento do tempo de exposição. A maior inviabilidade dos explantes pode ser atribuída aos danos celulares durante o reaquecimento pós-criopreservação, devido às temperaturas extremamente baixas e à formação de cristais de gelo. Agentes crioprotetores sintéticos, como DMSO e glicerol, são essenciais para proteger as células durante a criopreservação, apesar de seu potencial toxicidade. Estratégias que combinem diferentes agentes, incluindo antioxidantes, são cruciais para mitigar esses efeitos adversos e melhorar a eficácia do processo de conservação.

**Palavras-chaves:** *Hancornia speciosa*, criopreservação, solução de vitrificação de plantas, recursos genéticos.

## PVS2 VITRIFICATION SOLUTION IN THE REGENERATION OF MANGABA SHOOT TIPS

Article formatted according to the guidelines of the journal *Caatinga*

### ABSTRACT

*Hancornia speciosa* (mangaba) is a tree native to Brazil valued for its fruit and medicinal properties. The aim of this study was to assess the response of the Água Boa mangaba variety to droplet vitrification to establish a complementary ex situ conservation protocol for mangaba in the Active Germplasm Bank (BAG) at Embrapa Tabuleiros Costeiros. A randomized experimental design was used with three treatments varying times of exposure to PVS2 solution (10, 20, and 30 minutes), with seven replications per treatment. The control group included shoot tips not exposed to liquid nitrogen but immersed in PVS2. Results indicated no significant differences in regeneration of shoot tips not exposed to liquid nitrogen across different times of exposure to PVS2 solution, suggesting a negative linear pattern. For shoot tips exposed to PVS2 and cryopreserved in liquid nitrogen, no significant effect on regeneration was observed after 30 days of growth, but viability decreased with longer exposure times. Increased explant inviability may be attributable to cell damage during post-cryopreservation re-warming due to extremely low temperatures and ice crystal formation. Synthetic cryoprotective agents, such as DMSO and glycerol, are crucial for cell protection during cryopreservation, despite their potential toxicity. Strategies combining different agents, including antioxidants, are essential to mitigate these adverse effects and enhance the efficacy of the conservation process.

**Keywords:** *Hancornia speciosa*, cryopreservation, plant vitrification solution, genetic resources

## 5.1 Introdução

*Hancornia speciosa* Gomes, também conhecida popularmente como mangaba ou mangabeira, é uma árvore nativa do Brasil amplamente apreciada por seus frutos de sabor único e suas propriedades medicinais (Silva Junior, 2004). Segundo Fonseca *et al.* (2003), a mangabeira é classificada como parte da família Apocináceas, encontrada em diversas regiões do país como as regiões no Nordeste, desde os Tabuleiros Costeiros até as Baixadas Litorâneas, onde prospera em solos profundos, pobres e arenosos.

A mangaba é uma espécie botânica valorizada por sua relevância cultural e econômica. Além de ser apreciada pelo consumo de seus frutos, os extratos da planta são amplamente utilizados na medicina tradicional e na indústria alimentícia. Os frutos da mangaba desempenham um papel crucial como matéria-prima na produção de sucos e sorvetes, especialmente na região nordestina do Brasil, contribuindo significativamente para a economia local (Paula *et al.*, 2019; Nunes *et al.*, 2022a, 2022b). No entanto, a sobrevivência da mangabeira em seu habitat natural está ameaçada devido à urbanização e degradação ambiental, tornando imperativa a adoção de estratégias eficazes de conservação para preservar sua diversidade genética (Santos, 2015).

A preservação de plantas *in vitro* baseia-se na manutenção de coleções biológicas em ambientes laboratoriais, por meio da cultura de tecidos de plantas, que permite o armazenamento do germoplasma das plantas em condições assépticas, livres de patógenos. Dentre as estratégias, a criopreservação desempenha um papel crucial, possibilitando a manutenção e conservação em longo prazo de explantes a uma temperatura extremamente baixa de -196 °C em nitrogênio líquido (Panis, Swennen e Engelmann, 2001; Sartor, 2012). Essa técnica interrompe o crescimento e a multiplicação das plantas, facilitando a criação de um banco de germoplasma altamente eficiente em termos de espaço e recursos (Nascimento *et al.*, 2020). Apesar de a mangabeira ser uma espécie recalcitrante, protocolos de criopreservação tem sido obtidos com sucesso para outras espécies como calos embriogênicos de manga (Wu *et al.*, 2007) e embriões somáticos de cacau (Adu-Gyamfi e Wetten, 2012).

A *droplet-vitrification*, conhecida também como vitrificação em gotas, é amplamente empregada na criopreservação de tecidos vegetais. Explantes são imersos em soluções crioprotetoras contendo substâncias como dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, que atuam para proteger as células durante o congelamento (Hammond *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023).

As soluções crioprotetoras são resfriadas rapidamente, resultando na mudança do estado da água em uma estrutura amorfa vítria e assim, evitando a formação de cristais de gelo, que provocam danos às membranas celulares durante o processo de criopreservação (Panis, Piette e Swennen, 2005; Panis e Lambardi, 2005; Hammond *et al.*, 2019). Essas soluções atuam reduzindo significativamente o teor de água nos tecidos vegetais antes da exposição ao nitrogênio líquido. É importante ressaltar que o desempenho de crioprotetores pode variar dependendo dos componentes presentes, alguns dos quais têm a capacidade de penetrar nas membranas celulares, enquanto outros não (Engelmann e Dussert, 2013; Panis, Swennen e Engelmann, 2001).

A técnica de criopreservação requer pesquisas em função da espécie, especialmente em frutíferas tropicais (Santos e Salomao, 2023). Essa abordagem integra avanços científicos com a preocupação com a viabilidade dos tecidos vegetais, oferecendo uma perspectiva promissora para a preservação e o uso sustentável da diversidade genética das plantas (Faltus, Bilavcik e Zamecnik, 2021).

Santana *et al.* (2022) avaliaram a viabilidade da criopreservação de gemas apicais de mangaba usando a técnica de vitrificação por gotas. Os autores ao compararem a porcentagem de regeneração sem criopreservação NL- (controle), observaram que o acesso Água Boa (AB) apresentou 100% de explantes sobreviventes no 30º dia de cultivo após a exposição por 30min na solução PVS2. Apesar de terem sido expostos à solução crioprotetora e armazenados em nitrogênio líquido, os explantes mostraram uma capacidade de regeneração

comparável àquela observada nos controles que não foram expostos ao nitrogênio líquido. Esse resultado sugere que a solução PVS2 não foi tóxica ou prejudicial para o acesso Água Boa (AB), pelo menos durante este período de exposição. Para o acesso Japaratinga (JA) houve uma menor porcentagem de explantes inviáveis e maior de explantes sobreviventes em comparação com o acesso Terra Caída (TC) aos dias 30 e 60 de cultivo. Os autores destacam a necessidade de ajustes nas concentrações dos componentes do meio pós-cultura para alcançar taxas de regeneração mais altas. Conforme relatos de Santos et al. (2015), a pré-cultura em meio de cultura MS com 0,3 M de sacarose contribuiu para um aumento na sobrevivência dos explantes de mangabeira criopreservados.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do acesso Água Boa à técnica de vitrificação por gotas com o intuito de desenvolver futuramente um protocolo de conservação de longo prazo para os demais acessos do BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Obtenção de plântulas assépticas (fonte de explantes)

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, Sergipe. Foram utilizadas sementes do acesso de mangabeira Água Boa (AB) oriundo do BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros para obtenção de plântulas germinadas *in vitro*. Os frutos foram despolpados sob água corrente com auxílio de uma peneira, e as sementes lavadas em água estéril com Tween-20 e colocadas para secar à temperatura ambiente sob bandejas forradas com papel absorvente por 24h (Figura 1A). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por meio da imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por 5 min, hipoclorito de sódio a 2% por 20min (Figura 1B) e lavadas três vezes com água destilada estéril (Lédo, 2007) (Figura 1C).

As sementes foram inoculadas, na posição horizontal, em número de três a quatro em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel™. O meio de cultura teve pH ajustado para 5,8±0,1 e foi previamente autoclavado por 15min a 121±1 °C à pressão de 1,05 atm. As culturas foram mantidas até 150 dias após a germinação, em sala de crescimento com temperatura controlada de 27±2 °C, umidade relativa do ar em torno de 70%, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 52 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância.



**Figura 1.** Assepsia de sementes de mangaba do acesso AB (Água Boa). **A-** Sementes lavadas e secas por 24h em temperatura ambiente. **B-** Imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 20min na câmara de fluxo laminar. **C-** Sementes assépticas.

### 5.2.2 Pré-cultivo

Ápices caulinares com aproximadamente  $1,0 \text{ mm}^2$  foram excisados de plântulas *in vitro* e pré-cultivados em placas de Petri estéreis com meio de cultura WPM suplementado com  $0,625 \text{ M}$  de sacarose e gelificado com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel™. As culturas foram mantidas em sala de crescimento por 24h no escuro, com temperatura controlada de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar em torno de 70%.

### 5.2.3 Crioproteção e criopreservação

Após o pré-cultivo, os ápices caulinares foram imersos em solução de carregamento com  $2 \text{ M}$  de glicerol e  $0,4 \text{ M}$  de sacarose dissolvida em meio MS, à temperatura ambiente por 20 min. A vitrificação em gotas foi empregada conforme Santos et al. (2015) e Santana et al. (2022). Cada explante foi aspirado em uma gota de  $0,25 \text{ mL}$  da solução de PVS2 composta por  $0,4 \text{ M}$  de sacarose, 30% de glicerol, 15% de etilenoglicol e 15% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sakai *et al.*, 1990), e disposto sobre placa de alumínio ( $1,5 \times 0,5 \text{ cm}$ ) em

temperatura de 0 °C por 10, 20 e 30min (5 gotas/placa). Após cada período de exposição ao PVS2, as placas de alumínio contendo as gotas e ápices foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e, imediatamente, transferidas para criotubos e armazenadas por 24h em tambor de nitrogênio líquido.

#### 5.2.4 Recuperação

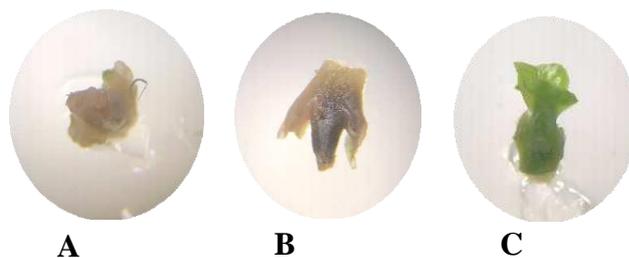
Após a criopreservação, os ápices caulinares foram reaquecidos em solução de descarregamento composta por meio de cultura MS suplementado com 1,2 M de sacarose à temperatura ambiente (27±2 °C) por 15 min. Posteriormente, os ápices foram transferidos para meio de regeneração WPM, suplementado com 0,09 M de sacarose, 0,002 g.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,02 g.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel™. As culturas foram mantidas no escuro por seis dias, sendo transferidas para sala de crescimento com temperatura controlada de 27±2 °C, umidade relativa do ar em torno de 70%, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 52 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância.

#### 5.2.5 Avaliações

Para avaliação do efeito do tempo de exposição dos ápices caulinares ao PVS2 criopreservados (NL+) ou não (NL-) no nitrogênio líquido, a porcentagem de regeneração foi observada aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Para tanto, foi utilizada uma escala de notas modificada estabelecida por Santana et al. (2022), conforme descrito na Tabela 1 e Figura 2. Para a porcentagem de explantes não viáveis foram considerados os que apresentaram notas 0 e 1 e como viáveis os que alcançaram nota 2.

**Tabela 1.** Classificação (escala de notas) das características de ápices caulinares de mangabeira observadas após o período de criopreservação durante regeneração.

Escala	Características observadas dos ápices caulinares após a criopreservação
0	Esbranquiçado (explante inviável)
1	Amarronzado (explante oxidado)
2	Esverdeado (explante viável).



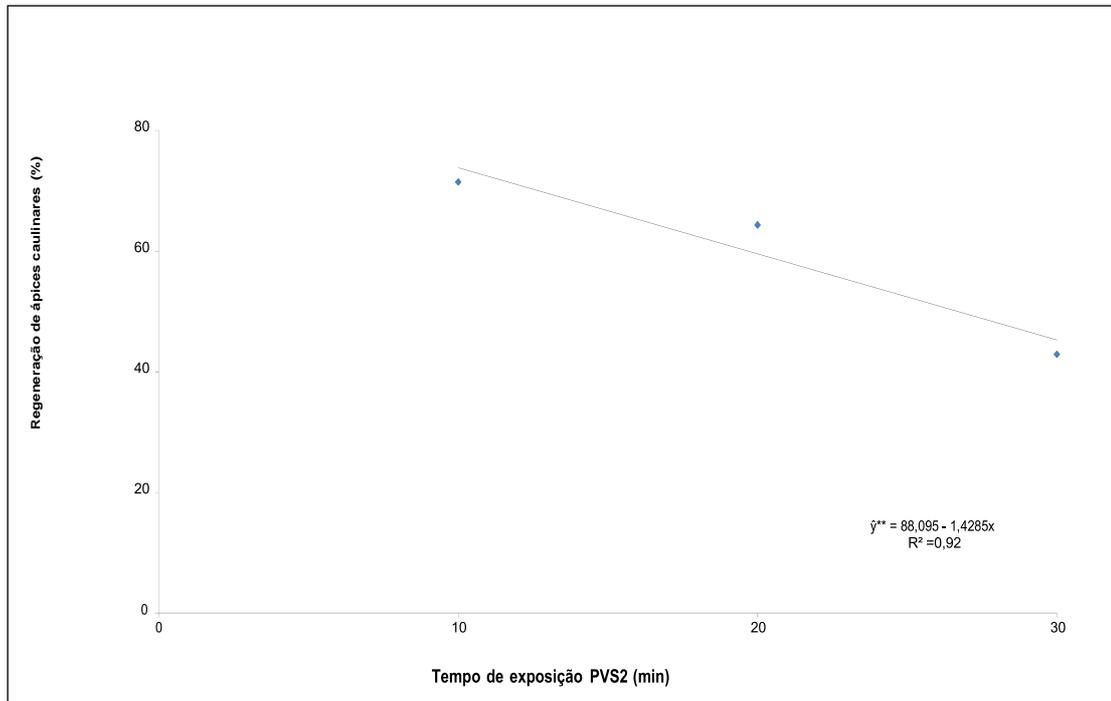
**Figura 2.** Ápices caulinares de mangabeira acesso AB. **A-** Esbranquiçado (explante inviável); **B-** Amarronzado (explante oxidado); **C-** Esverdeado (explante viável).

#### 5.2.6 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (tempos de exposição ao PVS2: 10, 20 e 30 min) e sete repetições. Como controle foi considerada a porcentagem de regeneração de ápices caulinares imersos em PVS2 em diferentes tempos não criopreservados.

### 5.3 Resultados e discussão

Para a porcentagem de regeneração do controle NL- (ápices caulinares não expostos ao nitrogênio líquido), não houve diferenças significativas entre os tempos de exposição à solução de PVS2. As médias apresentaram um comportamento linear negativo (Figura 3). Resultados semelhantes foram alcançados por Santana et al. (2022), que relataram um efeito negativo na viabilidade dos ápices caulinares de mangabeira com o aumento da exposição à solução PVS2 em 25, 50 e 75 min.



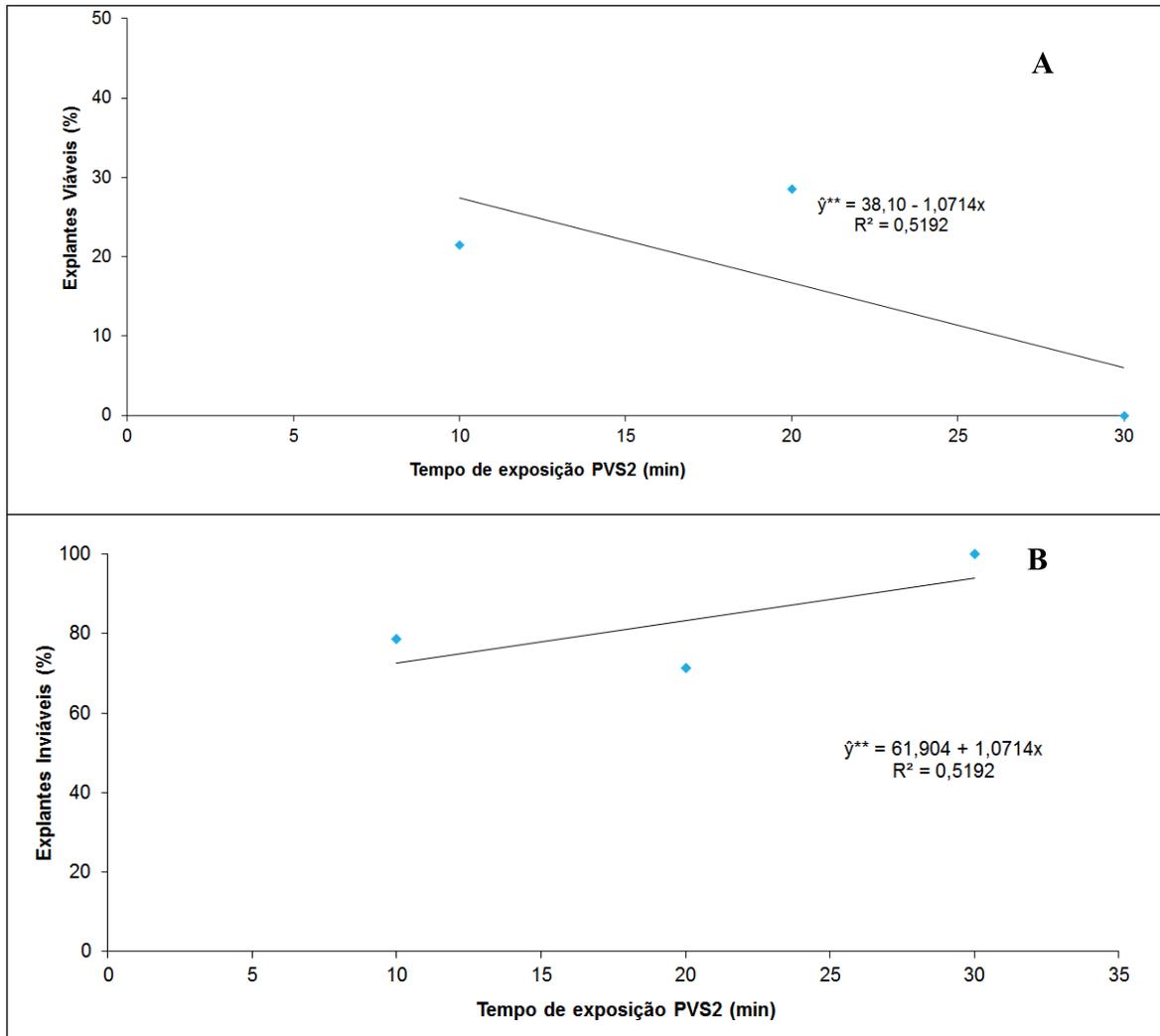
**Figura 3.** Porcentagem de regeneração de ápices caulinares de mangabeira acesso AB imersos em PVS2 e não criopreservados após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Os crioprotetores têm impactos variados no metabolismo e nas células, sendo cruciais para sua proteção, mas também podem afetar sua função biológica. Apesar de sua importância na preservação celular, seu potencial toxicidade é um desafio devido às altas concentrações requeridas, frequentemente acima dos níveis normais. São essenciais em métodos de armazenamento criogênico, como a vitrificação, mas o sucesso depende das concentrações e da velocidade de resfriamento (Tanaka et al., 2018).

Não houve um efeito significativo na regeneração dos ápices caulinares expostos ao PVS2 e imersos em nitrogênio líquido (NL+) após 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 4). Observou-se uma diminuição no número de explantes viáveis criopreservados com o aumento do tempo de exposição, no tempo de 20min houve aproximadamente 30% de explantes viáveis, enquanto no tempo de 30min não houve regeneração (Figura 4A). Em estudos de Santana et al. (2022) foram também observados efeitos negativos da exposição ao PVS2 na viabilidade de ápices caulinares de mangabeira. Porém, Santos et al. (2015) obtiveram protocolos bem-sucedidos de vitrificação e vitrificação por gotas de ápices caulinares de mangabeira. A pré-cultura de segmentos caulinares antes da excisão dos ápices de mangabeira da criopreservação promoveu uma taxa de regeneração superior a 70% em ambos os métodos.

Esse padrão foi evidente nos explantes inviáveis (Figura 4B), onde os explantes expostos a 30min de PVS2 e posteriormente criopreservados apresentaram 100% de inviabilidade. Descobertas recentes revelaram que o estresse osmótico promovido pela

diminuição de temperatura e diminuição drástica de água nas células é o principal fator na morte celular durante a criopreservação. Portanto, a adição de agentes crioprotetores, como DMSO, glicerol, etilenoglicol ou propilenoglicol, tornou-se crucial para proteger as células durante esse processo. Além disso, as taxas de resfriamento e descongelamento também influenciam significativamente a sobrevivência celular. Uma criopreservação bem-sucedida requer a inclusão de agentes crioprotetores (geralmente 10% de DMSO), taxas de resfriamento adequadas e armazenamento em nitrogênio líquido ou fase de vapor (Whaley et al., 2021).



**Figura 4.** Explantes de mangabeira acesso AB criopreservados (%) em função do tempo de exposição ao PVS2 **A-** Explantes viáveis (Esverdeados); **B-** Explantes inviáveis (Esbranquiçados).

A maior inviabilidade dos explantes para regeneração também pode ser explicada por danos celulares, na fase de aquecimento. Durante a criopreservação, como células ou tecidos ficam expostos a temperaturas extremamente baixas, pode ter ocorrido comprometimento da sua estrutura, função e a criação de cristais de gelo (Vaz et al., 2020). O aquecimento adequado após a criopreservação também é essencial para evitar danos às células (Roque-Borda et al., 2021).

Os agentes crioprotetores mais comuns são de origem sintética e podem afetar tanto as células quanto o ambiente. Eles podem ser tóxicos de várias maneiras, incluindo alterações na membrana celular e nas proteínas mitocondriais. Estratégias para reduzir a toxicidade incluem

a combinação de agentes com diferentes níveis de toxicidade e a adição de antioxidantes para proteger as células durante o processo de criopreservação (Marcantonini et al., 2022).

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, todos os explantes apresentaram oxidação, ou seja, houve formação de compostos oxidativos ou na oxidação de componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, pois mangabeira tem uma alta composição de lipídios.

De acordo com Ochatt et al. (2021), a criopreservação pode induzir estresse oxidativo, afetando a estabilidade celular interna e o equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os sistemas antioxidantes influenciam diretamente a eficácia da criopreservação, e monitorar a atividade de enzimas-chave pode fornecer insights valiosos sobre o metabolismo das plantas durante esse processo, potencialmente melhorando a recuperação do material vegetal criopreservado. Incorporar antioxidantes na solução de criopreservação pode neutralizar os ROS e proteger as células dos danos oxidativos. Para melhorar a viabilidade dos explantes durante e após a criopreservação, pode ser benéfico adicionar antioxidantes à solução PVS2. Esses antioxidantes ajudam a neutralizar as ROS que se formam durante o processo, reduzindo os danos oxidativos às células.

Araújo et al. (2024), relatam que diversos estudos estão em andamento para aprimorar a técnica de criopreservação da mangabeira. No entanto, até o momento, nenhum protocolo apresentou repetibilidade. Fica evidente a necessidade contínua de pesquisa e refinamento de técnicas de criopreservação para mangabeira para assegurar uma estratégia complementar à conservação de campo da diversidade genética da espécie.

#### 5.4 Conclusões

A técnica não apresentou eficiência na preservação de explantes de ápices caulinares de mangabeira do acesso Água Boa, criopreservados ou não. Novas investigações são necessárias para o estabelecimento de um protocolo para a conservação de longo prazo da espécie.

#### 5.5 Referências Bibliográficas

ADU-GYAMFI R.; WETTEN A. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos by vitrification. **Cryo Letters**, v. 33, n. 6, p. 494-505, 2012.

ARAÚJO, A. B. N. de *et al.* Cryopreservation techniques in genipap and mangaba: challengers and perspectives. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 3, p.01-18, 2024.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Criopreservação. *In*: NORMAH, M.; CHIN, H.; REED, B. (eds) Conservação de espécies de plantas tropicais. **Springer**, Nova York, NY, p. 107-119, 2013.

FALTUS, M.; BILAVCIK, A.; ZAMECNIK, J. Vitrification ability of combined and single cryoprotective agents. **Plants**, p. 15-34, 10, 2392, 2021.

FONSECA, F. K. P. *et al.* Efeito do balance hormonal na organogênese e multiplicação de brotos de mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes *in vitro*. *In*: Simpósio Brasileiro sobre a Cultura da Mangaba, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CDROM.

HAMMOND, H.S.D.; FALTUS, M.; ZAMECNIK, J. **Métodos de análise térmica como ferramenta para desenvolver protocolos de criopreservação de culturas propagadas vegetativamente** [Online First]. IntechOpen, 2019.

HAMMOND, S. D. H. *et al.* Droplet-vitrification methods for apical bud cryopreservation of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Rob.]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 147, n. 2, p.197-208, 2021.

LÉDO, A. da S. **Germinação *in vitro* da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 16 p.: il.- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

MARCANTONINI, G. *et al.* Natural cryoprotective and cytoprotective agents in cryopreservation: A focus on melatonin. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3254, 2022.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, C. M. do *et al.* Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2020.

NUNES, V. V. *et al.* Pharmaceutical, food potential and molecular data of *Hancornia speciosa* Gomes: A systematic review. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, n. 2, p. 525-543, 2022a.

NUNES, V. V. *et al.* Physiological and molecular changes in seeds of *Hancornia speciosa* Gomes stored in conservative solutions. **Journal of Seed Science**, v. 44, 2022b.

OCHATT, S. *et al.* Cryopreservation and in vitro banking: A cool subject – Preface from the editors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 1–5, 2021.

OLIVEIRA, A. C. A. *et al.* Cryopreservation of sugarcane species by droplet-vitrification. **Revista Foco**, v. 16, n. 8, p. e2792, 2023.

PAULA, L. C. *et al.* Influence of preservation methods on the bioactivity of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian savannah. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 403–409, 2019.

PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulturae**, n. 560, p. 79–86, 2001.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Vitrification of apical meristem droplets: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 1, p. 45-55, 2005.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Situação das tecnologias de criopreservação em plantas (culturas e árvores florestais). In: PANIS, B.; LAMBARDI, M. (eds) **O papel da biotecnologia**. Villa Gualino, Torino, Itália, p. 43-54, 2005.

ROQUE-BORDA, C. A. *et al.* Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: An overview of selected case studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 6157, 2021.

- 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.
- SANTANA, F. V. *et al.* Effects of droplet vitrification on the regeneration of apical shoot tips of mangabeira accessions. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, e38111738734, 2022.
- 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.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMAO, A. N. **Guia prático de criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal**. p. 36, 2023. (Documento 385).
- SANTOS, P. A. A. *et al.* Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for longterm storage. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 3, p. 289-296, 2015.
- SILVA JUNIOR, J. F. da. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 2004.
- TANAKA, D.; NIINO, T.; UEMURA, M. Cryopreservation of plant genetic resources. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Springer Singapore**, p. 355–369, 2018.
- VAZ, C. F. *et al.* Cellular alterations in kaolinitic apices and genetic stability of Eucalyptus plants submitted to cryopreservation. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94232–94255, 2020.
- WU, YONG-JIE *et al.* Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. var Zihua). **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 161-168, 2007.
- WHALEY, D. *et al.* Cryopreservation: An overview of principles and specific cell considerations. **Transplante Celular**, v. 30, p. 0963689721999617, 2021.

## 6. ARTIGO 3

### ESTUDOS SOBRE A MATRIZ DE ENCAPSULAMENTO DE ÁPICES CAULINARES DE JENIPEIRO

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Ciência Rural

#### RESUMO

A *Genipa americana* é uma árvore nativa das regiões tropicais da América do Sul e Central, conhecida no Brasil por suas frutas utilizadas na culinária e na indústria devido às suas propriedades medicinais e corantes naturais. Técnicas de criopreservação, como o encapsulamento, têm sido aplicadas para a conservação a longo prazo. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da composição da matriz de encapsulamento na regeneração de ápices caulinares de jenipapeiro com o intuito de desenvolver um protocolo futuramente de conservação de longo prazo para esta espécie. O experimento foi conduzido em um delineamento casualizado os ápices caulinares foram encapsulados em duas soluções dematriz: uma com alginato de sódio 3% em meio MS pleno (100%) sem cálcio, e outra na mesma proporção em meio ½ MS sem cálcio, seguido por polimerização em cloreto de cálcio 100 mM por 20 minutos. Os resultados mostraram que a matriz com MS Pleno favoreceu a regeneração dos ápices caulinares do acesso de jenipapeiro Arauá 4 sem criopreservação. A viabilidade dos explantes foi significativamente maior na matriz MS Pleno (72%) em comparação com a matriz ½ MS (43,33%). Não houve diferenças significativas entre as matrizes para os explantes oxidados, enquanto 80% dos explantes não oxidados permaneceram viáveis na matriz MS Pleno, em comparação com 41,67% na matriz ½ MS. Após sete dias de exposição ao nitrogênio líquido, os ápices caulinares mantiveram inicialmente a viabilidade com coloração verde, mas a maioria não regenerou satisfatoriamente após incubação no escuro, apresentando escurecimento por oxidação.

**Palavras-chave:** *Genipa americana*, criopreservação, encapsulamento-dessecação, alginato de sódio.

## **ANALYSIS OF THE ENCAPSULATION MATRIX OF SHOOT TIPS OF THE GENIP TREE**

Article formatted according to the guidelines of the journal *Ciência Rural*

### **ABSTRACT**

*Genipa americana* is a tree native to the tropical regions of South and Central America, known in Brazil for its fruit, which is used in cooking and in industry due to its medicinal properties and natural dyes. Cryopreservation techniques, such as encapsulation, have been applied for long-term conservation. The aim of this study was to investigate the effect of the composition of the encapsulation matrix on the regeneration of shoot tips of *Genipa americana* to develop a long-term conservation protocol for this species. The experiment was conducted in a randomized design where shoot tips were encapsulated in two matrix solutions: one with 3% sodium alginate in full-strength MS medium (100%) without calcium, and another with the same proportion in half-strength MS medium without calcium, followed by polymerization in 100 mM calcium chloride for 20 minutes. The results showed that the full-strength MS matrix favored the regeneration of shoot tips of *Genipa americana* 'Araúá 4' without cryopreservation. The viability of explants was significantly higher in the full-strength MS matrix (72%) compared to the half-strength MS matrix (43.33%). There were no significant differences between the matrices for oxidized explants, whereas 80% of the non-oxidized explants remained viable in the full-strength MS matrix compared to 41.67% in the half-strength MS matrix. After seven days of exposure to liquid nitrogen, the encapsulated shoot tips initially maintained viability, exhibiting green color, but most did not regenerate satisfactorily after incubation in the dark, and they darkened due to oxidation.

**Keywords:** *Genipa americana*, cryopreservation, encapsulation-drying, sodium alginate

## 6.1 Introdução

*Genipa americana* L. pertence à família Rubiaceae, é uma espécie arbórea endêmica das regiões tropicais da América do Sul e Central, comumente conhecida no Brasil como jenipapeiro ou jenipapo (Delprete, Smith e Klein, 2005). Sua distribuição geográfica vai do Amapá a São Paulo e Mato Grosso, com amplo cultivo em pomares por todo o Brasil, incluindo estados do Sul (Corrêa, 1984). O fruto do jenipapo é um ingrediente comum na culinária em sucos, doces, licores e sua polpa possui propriedades medicinais. Além disso devido aos corantes naturais presentes em seus extratos, a planta possui aplicações industriais adicionais (Hamacek et al., 2013).

O termo conservação *ex situ* refere-se à preservação de espécies, variedades genéticas ou ecossistemas fora dos seus habitats naturais. Esse processo geralmente envolve coleções em ambientes controlados, como jardins botânicos, bancos de germoplasma, zoológicos, protetores ou outras instalações especializadas (Lima et al., 2021). Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), seja em campo ou de sementes, tem sido utilizados para conservação dos recursos genéticos. Esses bancos têm como principais objetivos entender e enriquecer a diversidade genética, mantendo uma ampla coleção de exemplares da espécie. Esse esforço não apenas promove a conservação, mas também fornece materiais com variabilidade genética para programas de melhoramento genético. Além disso, permite uma análise minuciosa do nível de variabilidade presente nessas coleções (Oliveira et al., 2018).

No Brasil os principais bancos de germoplasma (BAGs) de jenipapo estão localizados na Universidade Federal do Recôncavo Baiano em Cruz das Almas, BA, e na Embrapa Tabuleiros Costeiros (RGVNe, 2022). No estado de São Paulo, em Rosana, foi implementado um BAG contendo 30 acessos de *Genipa americana* coletados em áreas inundadas pelo Reservatório Engenheiro Sérgio Motta (Melo, 2016). O BAG Jenipapo, estabelecido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros em 2009, possui 172 acessos e tem gerado inúmeras publicações. Em 2020 foi publicado o Manual de Descritores específicos para a espécie (Silva et al., 2020), com o objetivo de examinar o enriquecimento, desenvolvimento e caracterização dos acessos que compõem esse germoplasma.

A conservação de plantas *in vitro* envolve a manutenção de coleções de plantas em instalações laboratoriais ou tanques criogênicos. A utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais permite rápida propagação e armazenamento de germoplasma em condições assépticas e livres de patógenos. O principal objetivo dessa tecnologia é garantir que, dentro dessa cápsula, o explante vegetal possa se desenvolver de maneira saudável, como se estivesse num berço aconchegante, pronto para crescer tanto em laboratório quanto no campo (Abreu, 2023). Dentre as estratégias a criopreservação desempenha um papel fundamental, permitindo a manutenção e a conservação em longo prazo de explantes a uma temperatura extremamente baixa de -196 °C em nitrogênio líquido (Sartor et al 2012). A interrupção do crescimento celular e sua multiplicação permitem a formação de bancos de germoplasma altamente eficientes em espaço e recursos (Santos e Salomão, 2016). As técnicas de criopreservação variam de acordo com fatores físicos e químicos que visam a integridade celular evitando a formação de cristais de gelo em espaços extracelulares (Jaiswal e Vagga, 2022). Resultados obtidos para eixo cotiledonar de jenipapeiro indicam a viabilidade da criopreservação para a espécie (Santos e Salomão, 2016; Nascimento et al., 2020).

O encapsulamento consiste em envolver embriões somáticos ou outros explantes em uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio, criando sementes artificiais que podem regenerar-se e gerar novas plantas mesmo após armazenamento de acordo com Kitto e Janick (1982). O método de encapsulamento-dessecação complementa essa técnica, permitindo a desidratação dos explantes encapsulados para minimizar danos celulares (Benelli et al., 2013, Sarto et al., 2018). A matriz de alginato de sódio oferece várias vantagens, incluindo proteção dos explantes, facilidade de armazenamento e transporte, além da possibilidade de incorporação de nutrientes e reguladores de crescimento (Guerra et al., 2001; Soneji et al., 2002). No entanto, para alcançar o máximo desempenho na produção e armazenamento

dessas sementes sintéticas, é necessário considerar diversos fatores. A escolha criteriosa dos explantes, do agente encapsulante e da matriz de encapsulamento tem sido fundamental para o sucesso dessa tecnologia em plantas medicinais (Gantait et al., 2015). O nível adequado de umidade também é fator determinante no processo devido ao seu impacto sobre as organelas e a estrutura molecular das células, levando a uma regeneração reduzida após o descongelamento (Sershen et al., 2012).

O método de encapsulamento-dessecação complementa essa técnica, permitindo a desidratação dos explantes encapsulados para minimizar danos celulares (Benelli et al., 2013). A matriz de alginato de sódio oferece várias vantagens, incluindo proteção dos embriões, facilidade de armazenamento e transporte, além da possibilidade de incorporação de nutrientes e reguladores de crescimento (Guerra et al., 2001). Sá et al. (2015) em estudos preliminares relataram que a crioproteção e a desidratação não alteram a viabilidade dos ápices caulinares de jenipapeiro encapsulados ou não encapsulados, sendo que a imersão por 24 horas em solução crioprotetora e a desidratação em câmara de fluxo laminar por 2 horas foram os melhores tratamentos para ápices não criopreservados.

Resultados preliminares obtidos por Sá et al. (2015) recomendam a imersão em uma solução crioprotetora por 24h, seguida de desidratação por 2h em câmara de fluxo laminar, como um método eficaz para a criopreservação do jenipapo por encapsulamento-desidratação. Já Santos e Salomão (2016) observaram que, apesar de altas taxas de germinação, a eficácia da criopreservação para o germoplasma de *G. americana* foi reduzida com diferentes níveis de umidade. Em contraste, Figueiredo et al. (2018) concluíram que a preservação das unidades encapsuladas a 15 °C, sem pré-tratamento com sacarose, é viável para a conservação da espécie. Nascimento et al. (2016) relataram altas taxas de sobrevivência para diferentes acessos de jenipapeiro, indicando tempos variados de dessecação.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da composição da matriz de encapsulamento na regeneração de ápices caulinares de jenipapeiro com o intuito de desenvolver um protocolo de conservação em longo prazo para a espécie.

## 6.2 Material e Métodos

### 6.2.1 Material vegetal e assepsia

Para obtenção das plantas assépticas *in vitro* doadoras de ápices caulinares foram coletados frutos maduros de acesso Arauá 4 do BAG Jenipapo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Nossa Senhora das Dores - Sergipe.

As sementes foram manualmente extraídas dos frutos e dispostas sobre papel toalha para remover o excesso de água, à temperatura ambiente por 24h. Após esse período, foram submetidas à assepsia em uma câmara de fluxo laminar. Inicialmente foram lavadas com água estéril para a completa remoção da polpa, imersas em álcool etílico 70% (v/v) por 2min e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% por 15min sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes com água estéril e mantidas sobre papel toalha para retirada do excesso de umidade.

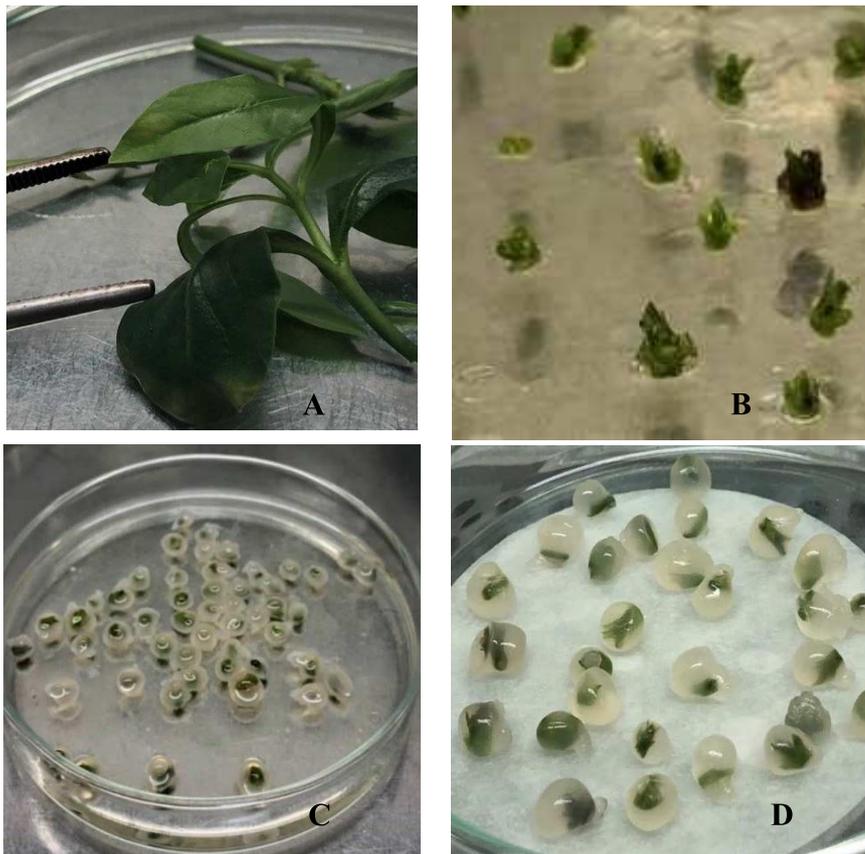
As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo 30 g/L de sacarose e gelificadas com 3 g/L de Phytigel™. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  e previamente autoclavado a  $121 \pm 1$  °C sob pressão de 1,05 atm. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, iluminação de 1 lumen/m<sup>2</sup> e umidade relativa média de cerca de 70%.

### 6.2.2 Excisão de ápices caulinares, encapsulamento, e desidratação

Após três meses de cultivo, foram excisados 130 ápices caulinares do acesso Arauá 4, cada um com, aproximadamente, 5mm de comprimento e foram mantidos em placas de Petri contendo papel de filtro e água estéril autoclavada. Para avaliar a capacidade regenerativa,

cerca de cinco ápices caulinares foram inoculados diretamente em placas estéreis contendo 15 mL de meio de cultura de regeneração (MS + 3% de sacarose + 1 mg/L de BAP+ 3 g/L Phytigel™) como controle 1.

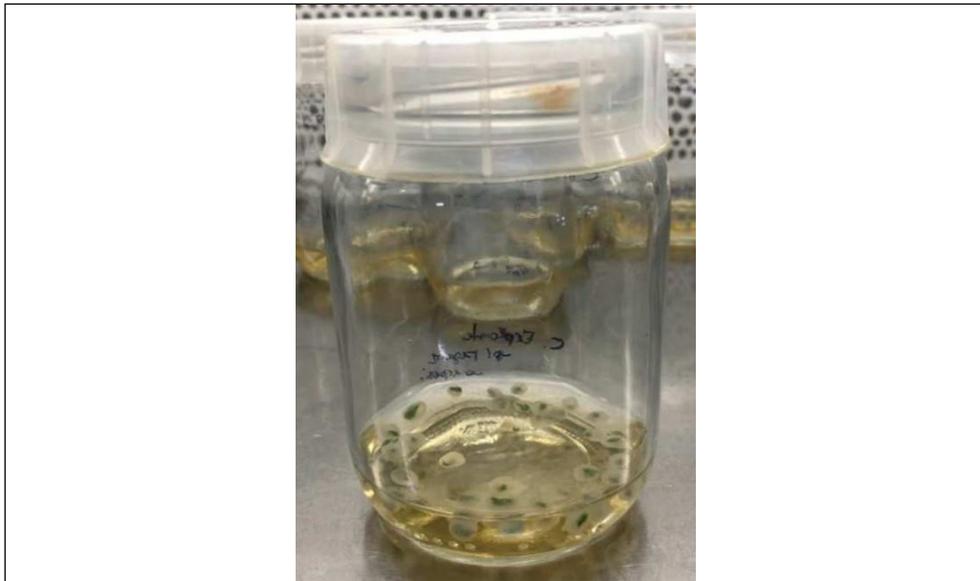
Os demais ápices (125) foram submetidos à imersão em duas soluções matriz de meio MS, matriz de encapsulamento 1 – 100 mL de solução de alginato de sódio 3% (Sigma- Aldrich A20-33) em 100 mL de meio MS pleno (100%) sem cálcio; matriz de encapsulamento 2 – 100 mL de solução de alginato de sódio 3% (Sigma-Aldrich A20-33) em 100 mL de meio ½ MS sem cálcio. Após a imersão, os ápices caulinares foram transferidos para uma solução de polimerização contendo 100 mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Sigma- Aldrich C10-16 e agitados por 20 min, seguido pela remoção do excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando papel filtro (Figura 1).



**FIGURA 1.** Etapas de encapsulamento. **A** – Excisão de ápices caulinares de plântulas de jenipapeiro; **B**- Ápices caulinares excisados; **C**- Ápices caulinares imersos em solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para polimerização; **D**- Ápices caulinares encapsulados.

Para a crioproteção, os explantes encapsulados foram imersos por 24h em meio líquido de MS contendo 0,625 M de sacarose mantidos sob agitação a 100 rpm em temperatura ambiente e no escuro (20 cápsulas com ápices/erlenmeyer) (Figura 2). A fim de avaliar possíveis efeitos do encapsulamento na regeneração foram inoculadas 10 cápsulas (5/matriz) imediatamente no meio de regeneração como controle 2.

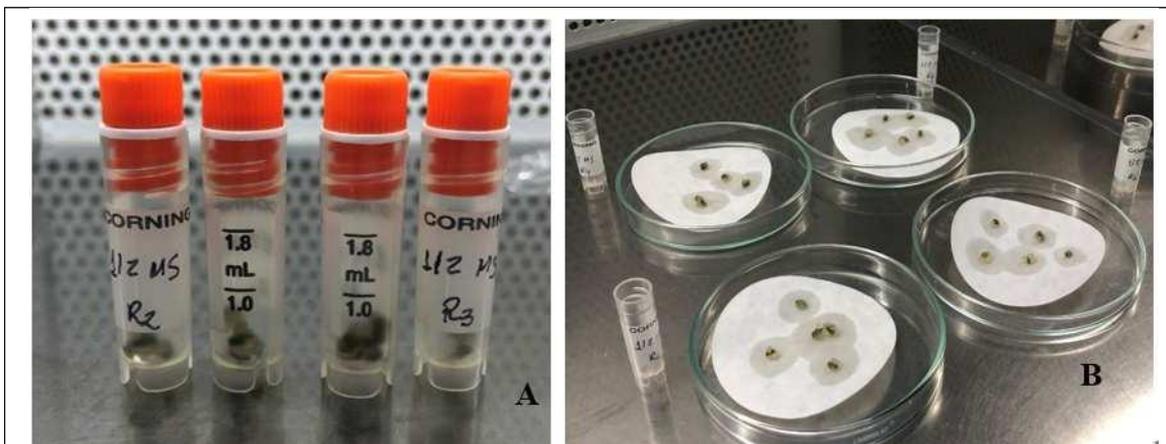
Para a desidratação em câmara de fluxo laminar, inicialmente as cápsulas foram dispostas em placas de Petri sobre papel filtro para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram mantidas por 4h, a uma temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C, conforme metodologia de Sá et al. (2015) e Nascimento et al. (2016).



**FIGURA 2.** Ápices caulinares de jenipapeiro acesso AR4 encapsulados imersos por 24h em meio de crioproteção.

### 6.2.3 Criopreservação, reaquecimento e regeneração

Antes da criopreservação dos ápices caulinares encapsulados, 10 cápsulas (cinco/matriz de encapsulamento) foram inoculadas no meio de regeneração (controle 3). Para o armazenamento em NL+, utilizou-se 40 explantes encapsulados (vinte/matriz), sendo cinco cápsulas/criotubo (Figura 3A). Após sete dias em NL+, as cápsulas foram transferidas para meio de reaquecimento (meio MS com 1,2 M de sacarose) por 10min em temperatura ambiente. Em seguida, após remoção do excesso de meio com papel filtro, as cápsulas foram submetidas a um pequeno corte para facilitar a ruptura pelo explante na regeneração (Figura 3B).



**FIGURA 3.** Criopreservação. **A-** Ápices caulinares encapsulados em criotubos; **B-** Cápsulas após criopreservação e remoção do excesso de meio reaquecimento.

As cápsulas foram inoculadas em meio de regeneração (MS gelificado com 3% de sacarose, 1 mg/L de BAP e 3 g/L Phytigel™) e mantidas no escuro por sete dias. Posteriormente, foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob luz indireta, iluminadas com 1 lumen/m<sup>2</sup> e com umidade relativa média de cerca de 70%.

Foram avaliadas a porcentagem de regeneração de explantes criopreservados ou não (NL +e NL-) após 15 dias de cultivo *in vitro*, ápices caulinares não oxidados (ENO), oxidados (AO) e verdes (AV).

#### 6.2.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 4 repetições, sendo cada parcela constituída por cinco ápices caulinares encapsulados. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (Ferreira et al., 2019).

### 6.3 Resultados e discussão

Houve diferença significativa entre as matrizes de alginato de cálcio na regeneração dos ápices caulinares encapsulados não criopreservados (NL-). Ápices caulinares não criopreservados e com matriz MS pleno (100%) apresentaram maior regeneração (78%) do que a matriz ½ MS (43,33%) (Tabela 1). Em ambos os tratamentos não houve regeneração após a criopreservação (NL+), sendo assim, não houve diferença significativa.

Nascimento et al. (2020) investigou o uso de matrizes de encapsulamento para ápices caulinares de jenipapo para a conservação em nitrogênio líquido, incluindo ½ MS, WPM e ½ WPM. Os resultados indicaram que a composição da matriz de encapsulamento não influenciou a porcentagem de regeneração em NL-.

**Tabela 1.** Porcentagem de regeneração de ápices caulinares sem (NL-) e com criopreservação (NL +), do acesso Arauá 4 de *Genipa americana* L. após 15 dias de cultivo *in vitro* em função das matrizes de encapsulamento.

Regeneração (%)	Matriz de Encapsulamento	
	MS pleno (100%)	½ MS
NL-	78,00 a	43,33 b
NL+	0,00 a	0,00 a
CV %	58,66	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05\%$ ).

Após a exposição dos ápices caulinares ao nitrogênio líquido (NL+), foi observado um impedimento na regeneração do explante. Um dos possíveis fatores que poderiam ter contribuído para isso seria a concentração de alginato de sódio, que pode não ter resistido às temperaturas extremamente baixas, porém a concentração que foi utilizada seria a ideal segundo Gantait et al. (2015). Os autores identificaram que uma solução contendo 3% de alginato de sódio e 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  promoveu uma troca iônica mais eficiente entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando em cápsulas compactas e transparentes. Concentrações mais baixas de alginato de sódio (1 e 2%) resultaram em cápsulas assimétricas e frágeis, enquanto concentrações mais altas (4 e 5%) resultaram em cápsulas excessivamente firmes, dificultando a conversão das sementes sintéticas e, conseqüentemente, a ruptura das cápsulas para a regeneração. É possível que outros fatores, como a quantidade de água presente na cápsula exposta ao NL, também tenham desempenhado um papel, potencialmente levando à

formação de cristais de gelo. De acordo com Paiva et al. (2023), o sucesso da criopreservação depende da compreensão contínua das propriedades físicas e químicas durante o ciclo de congelamento e descongelamento, pois a formação de cristais de gelo e os danos celulares resultantes podem comprometer a viabilidade dos tecidos.

Ao analisar os explantes viáveis (AV), observa-se uma diferença significativa entre as matrizes. A média de viabilidade para a matriz ½ MS foi de 43,33%, enquanto que para o MS pleno foi de 72%, uma diferença de cerca de 28,67% (Tabela 2). Além disso, houve uma diferença significativa para os explantes não oxidados (ANO), sendo que na matriz com MS pleno, 80% dos explantes não apresentaram oxidação, enquanto na matriz ½ MS houve 41,67%. Considerando os explantes oxidados (AO) não houve diferenças entre as matrizes.

**Tabela 2.** Porcentagem de ápices caulinares viáveis (AV), oxidados (AO) e não oxidados (ANO) do acesso Arauá 4 de *Genipa americana* L. após 15 dias de cultivo *in vitro* em função das matrizes de encapsulamento.

(%)	Matriz de Encapsulamento	
	MS pleno (100%)	½ MS
AV	72,00 a	43,33 b
AO	16,00 a	40,00 a
ANO	80,00 a	41,66 b
CV % 56,18		

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

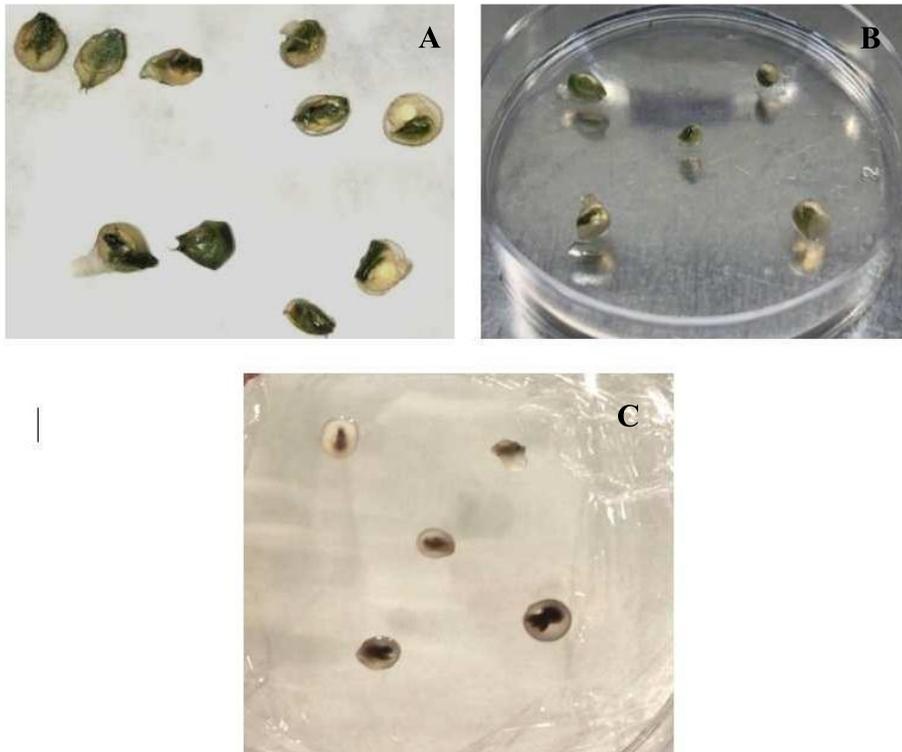
A matriz composta de MS pleno teve um efeito positivo nos explantes após o processo de encapsulamento e regeneração, indicando o efeito da composição da matriz de encapsulamento na qualidade dos explantes. Guedes et al. (2006) observaram que o meio de cultura MS (100%) foi o mais eficaz para promover o desenvolvimento e crescimento saudável de plantas de pimenta-longa provenientes de sementes sintéticas ou encapsuladas, atingindo uma média de 79,1% de regeneração. Esse aumento provavelmente foi impulsionado pelo crescimento vigoroso dos explantes encapsulados, o que lhes proporcionou maior capacidade de romper as cápsulas durante o processo de germinação. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2008), em sementes pré-germinadas de pimenta-longa. A combinação de ¾ MS (75%) e MS (100%) com carvão ativado (3 g/L) proporcionou percentuais de conversão das sementes pré-germinadas de pimenta-longa significativamente superiores ao tratamento onde se utilizou a água como constituinte do endosperma artificial.

Para Figueiredo et al. (2018) o aumento da concentração da matriz de alginato de sódio não causa maior rigidez nas cápsulas e assim, não é suficiente para influenciar de forma negativa na porcentagem de ruptura. Entretanto, Patel et al. (2000) afirmam que dependendo da espécie, a resistência e a firmeza da cápsula são elementos cruciais a serem analisados durante o procedimento de encapsulamento, já que têm um impacto significativo na taxa de conversão das unidades encapsuladas.

Os ápices caulinares encapsulados nas matrizes MS pleno e ½ MS após a desidratação em câmara de fluxo laminar por 4h, apresentaram viabilidade mantendo a coloração verde dos seus tecidos (Figura 4A). Sá et al. (2015) em trabalho com ápices caulinares de *Genipa americana* L. com desidratação em solução crioprotetora por 24 e 48 h, relataram a redução da umidade das cápsulas de 66,68% para 23,31 e 28,47%, respectivamente. Quando as

cápsulas foram desidratadas na câmara de fluxo laminar por 2 e 4h houve maior redução da umidade (22,47% e 7,23%, respectivamente), sem afetar a taxa de regeneração de ápices, não criopreservados, superiores a 75 %.

Com relação aos ápices caulinares encapsulados e expostos ao nitrogênio líquido(NL+) por sete dias, observou-se inicialmente a manutenção da viabilidade com a coloração verde (Figura 4B). Entretanto, após esse período de incubação no escuro, os explantes não regeneraram satisfatoriamente, sendo que a maioria apresentou escurecimento por oxidação (Figura 4C).



**FIGURA 4.** Ápices caulinares de jenipapeiro acesso AR 4 encapsulados, desidratados em câmara de fluxos laminar por 4h e criopreservados do acesso de jenipapeiro Arauá 4. **A:** Ápices encapsulados e desidratados em câmara de fluxo laminar por 4h, **B:** Ápices viáveis com coloração verde até sete dias após NL + e na ausência de luz, **C:** Ápices com coloração escura (oxidação) após sete dias na ausência de luz.

Conforme relatado por Ren et al. (2022), células vegetais sob estresses podem acionar um programa de morte celular (PCD) que ativa genes em resposta aos estresses e estão relacionados à queda de viabilidade em células submetidas à criopreservação. Os mesmos autores em estudos com criopreservação de sementes de *Paeonia emodi*, relatam que a umidade antes da criopreservação tem certa influência na capacidade de produção de enzimas do estresse oxidativo (ROS) das sementes após criopreservação e, portanto, tem uma influência significativa na viabilidade. O conteúdo reduzido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atrasar a ocorrência de DCP, aumentando a taxa de sobrevivência celular depois da criopreservação (Zhang et al., 2015).

Provavelmente o teor de umidade dos explantes após 4h de desidratação por fluxo de ar não foi adequada a fim de preservar a viabilidade e regeneração dos ápices caulinares. Resultados obtidos por Souza et al. (2023) utilizando sílica gel para desidratação de sementes *Genipa americana* L. demonstraram que a redução do teor de umidade de 47 para 10% (36 h)

e mínimo de 14% (20h) possibilitou o aumento das taxas de viabilidade, germinação e formação de plântulas normais após o armazenamento em nitrogênio líquido.

Estudos posteriores acerca do processo de desidratação de ápices caulinares de jenipapeiro com mudanças no conteúdo de ROS em explantes com diferentes umidades antes e depois da criopreservação são necessários para obtenção de um protocolo eficiente.

#### 6.4 Conclusões

A matriz de encapsulamento com MS pleno tem efeito benéfico na regeneração de ápices caulinares do acesso de jenipapeiro Arauá 4 sem criopreservação.

#### 6.5 Referências Bibliográficas

ABREU, F. Tecnologia de sementes sintéticas: a inovação da biotecnologia vegetal. **Revista Blog do Profissão Biotec**, v. 10, 2023.

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.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. p. 980.

DELPRETE, P. G.; SMITH L. B.; KLEIN R. M. **Flora Ilustrada Catarinense: Rubiáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2005. p. 493.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FIGUEIREDO, J. R. M. *et al.* Conservação de *Genipa americana*: Técnicas de encapsulamento e crescimento lento. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, p. 9, 2018.

GANTAIT, S. *et al.* Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 98, 2015.

GUEDES, R. D. S. *et al.* **Produção de unidades encapsuláveis de pimenta longa a partir de sementes pré-germinadas**. p. 4, 2006. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/504951/1/13828.pdf>>. Acesso em: 10 may. 2024.

GUERRA, M. P. *et al.* Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p.117-128, 2001.

HAMACEK, F. R. *et al.* Valor nutricional de jenipapo. **Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2013.

JAISWAL, A. N.; VAGGA, A. Cryopreservation: a review article. **Cureus**, v. 14, n. 11, e31564, 2022.

- KITTO, S. K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488, 1982.
- LIMA, A. P. P. S. *et al.* Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4, p. 763-771, 2021.
- MELO, M. F. V. Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em jenipapo (*Genipa americana* linnaeus) utilizando 14 marcadores microsatélites. 2016. 64p. **Tese** (Doutorado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP, 2016.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NASCIMENTO, C. M.; OLIVEIRA, L. A. R.; Silva, A. V. C.; CASTRO, EVARISTO MAURO DE; LEDO, A. S. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, p. 1-11, 2020.
- NASCIMENTO, C. M. do; GONDRA, R. M. de; LEDO, A. da S. Efeito de tempos de dessecação de sementes de *Genipa americana* L. na umidade para fins de criopreservação. *In*: Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 6., Aracaju, 2016. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. A. *et al.* Induction and growth curve of calli from leaf and nodal explants of genipap. **Bioscience Journal**, v. 34, p. 161-167, 2018.
- PAIVA, R. P.; COIMBRA, M. C.; CASTRO, A. H. F. Criopreservação de plantas medicinais: uma revisão. *In*: **Ciência das Plantas: desafios e potencialidades em pesquisa**. [sl] Editora Científica Digital, 2023. p. 36–51.
- PATEL, A.V. *et al.* A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**, v.19, p.868-874, 2000.
- PEREIRA, J. E. *et al.* Composition of the encapsulation matrix in the formation and conversion of synthetic long pepper seeds. **Brazilian Horticulture**, v. 26, p. 93-96, 2008.
- REN, R. *et al.* ROS-induced PCD affects the viability of seeds with different moisture content after cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, n. 1, p. 623- 633, 2022.
- RGVNe. **Rede de recursos genéticos vegetais do Nordeste**. Bancos e Curadorias. 2022. Disponível em: <https://www.rgvnordeste.org/bancos-e-curadorias/>.
- SÁ, F. P. D. *et al.* Encapsulation, cryoprotection and dehydration in the regenerative capacity of shoot apices of *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1939-1945, 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. de; ALMEIDA, F. A. C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.

- SARTO, M. T. *et al.* Unidades encapsuláveis de gemas de *Solanum calvescens* (SOLANACEAE). *In: Semana Integrada*, 4. **Anais...** Pelotas, UFPEL, 2018.
- SERSHEN, P. *et al.* 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, p. 171-186, 2012.
- SILVA, A. V. C. da; LÉDO, A. S. da; SILVA JÚNIOR, J. F. da. **Descritores para jenipapeiro**. Brasília: Embrapa, 2020. 63 p.
- SOUZA, R. R. de *et al.* Cryopreservation of *Genipa americana* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 54, e20228531, 2023.
- SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 10, p. 891-894, 2002.
- ZHANG, D. *et al.* ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 1499-1513, 2015.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos revelaram que, para o jenipapeiro, a matriz de encapsulamento utilizando MS pleno tem um efeito positivo na regeneração de ápices caulinares, mesmo sem a criopreservação. No caso da mangaba, a exposição prolongada ao PVS2 impacta negativamente a regeneração dos explantes de ápices caulinares do acesso Água Boa, tanto criopreservados quanto não criopreservados.

Esses resultados ressaltam a importância de realizar mais pesquisas em técnicas de criopreservação, como a vitrificação em gotas, o encapsulamento e a conservação em nitrogênio líquido, especialmente para espécies nativas como *Hancornia speciosa* Gomes e *Genipa americana* L., que enfrentam desafios significativos de conservação. Estudos como esses auxiliam para os próximos e para um possível protocolo de conservação para mangaba e jenipapo.

Ambas as espécies estão enfrentando uma perda gradual de sua diversidade genética, o que sugere um risco iminente de perda desses recursos valiosos. Isso destaca a urgência de implementar estratégias eficazes de conservação para garantir a preservação desses materiais genéticos.



