



Comunicação Breve

ENCAPSULAMENTO-DESIDRATAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE *Eugenia dysenterica*

Andreia Alves da Costa Silveira^{1*}, Sérgio Tadeu Sibov¹¹ Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Av. Esperança s/n, Campus Samambaia, CEP: 74.690-900, Goiânia, GO,*Autor correspondente. E-mail: andreaac2@gmail.com

INFO ARTICLE

Histórico do artigo

Recebido: 10 de janeiro de 2019

Aceito: 08 de setembro de 2019

Palavras-chaves:

Cagaiteira
Conservação *ex situ*
Criopreservação
Sementes sintéticas

RESUMO

Eugenia dysenterica, também conhecida como cagaiteira é uma espécie do Cerrado que possui potencial econômico, entretanto sua propagação convencional torna-se dificultada pelo fato de possuir sementes recalcitrantes, que perdem a viabilidade em aproximadamente 50 dias. A tecnologia de encapsulamento-desidratação tem se mostrado eficiente para a conservação deste tipo de espécie, tanto para armazenamento em câmara fria, quanto para a criopreservação. Objetivou-se a obtenção de um protocolo de sementes sintéticas e criopreservação de *E. dysenterica*, em que se utilizou ápices caulinares obtidos de plantas desenvolvidas *in vitro*. Os tratamentos consistiram de três diferentes concentrações de sacarose (0,25M L⁻¹, 0,5ML⁻¹, e 0,75ML⁻¹) combinadas a três períodos de secagem (0 h, 1 h e 2 h). O melhor tratamento para ápices não criopreservados constituiu de 0,25M de sacarose combinado á 1 h de desidratação, com 55,55% de regeneração. A taxa de regeneração nula de ápices criopreservados indica provável ruptura no sistema de membranas causada pela desidratação e congelamento das cápsulas. Entretanto, o protocolo de sementes sintéticas desenvolvido no presente trabalho poderá ser utilizado para conservação à médio prazo da espécie, sendo necessário novos estudos para confirmar este potencial.

Eugenia dysenterica (Mart.) D.C., também conhecida como cagaiteira, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, que possui potencial econômico. A espécie é apreciada principalmente pelo consumo de seus frutos, além de ser apontada com potencial medicinal (Daza et al., 2017). Com o desmatamento desenfreado, a espécie corre o risco de perder genes importantes, os quais poderiam ser utilizados em programas de melhoramento no futuro. Por possuir sementes de comportamento recalcitrante, as quais perdem a viabilidade em aproximadamente 50 dias, a conservação de germoplasma da espécie via banco de sementes torna-se inviável. Somado a isso, a frutificação se dá apenas uma vez ao ano em condições de Cerrado, consistindo entre os meses de setembro-outubro (Andrade et al., 2003). Por estes motivos, o desenvolvimento de outros métodos de conservação *ex situ* para a espécie se tornam necessários.

A técnica de encapsulamento-desidratação foi proposta pela primeira vez por Febre e Dereuddre (1990) com o objetivo de unir a criopreservação com a tecnologia de sementes sintéticas. Inicialmente, sementes sintéticas foram propostas para embriões somáticos, os quais podem ser armazenados por médio prazo em câmara fria, e/ou

semeados diretamente no solo. Com o passar do tempo, outros protocolos utilizando sementes sintéticas para conservação e/ou preservação de explantes foram desenvolvidos, utilizando, por exemplo, microbrotos, gemas axilares, e ápices caulinares (Ahmed et al., 2015). A criopreservação é uma técnica promissora de armazenamento de germoplasma por tempo indeterminado, pois, sob temperaturas inferiores a -130°C o metabolismo celular torna-se quase ou completamente paralisado (Hubel & Skubitz, 2017). O encapsulamento-desidratação somado à criopreservação é indicado para a conservação de espécies tropicais com sementes recalcitrantes, por ser um método menos tóxico aos tecidos vegetais (Shibli et al., 2016). Considerando que o desmatamento desenfreado do domínio Cerrado, assim como as vantagens da tecnologia de sementes sintéticas para a conservação e preservação de material vegetal, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de sementes sintéticas de ápices caulinares de *E. dysenterica* por meio de encapsulamento-desidratação, assim como o desenvolvimento de protocolo de criopreservação destas sementes sintéticas.

Frutos de *E. dysenterica* foram coletados no mês de outubro de 2013, na Coleção de Espécies Frutíferas do Cerrado da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, nas seguintes coordenadas geográficas: -16.594614,-49.289011. Cerca de 100 sementes foram retiradas dos frutos após a coleta e tiveram seu tegumento retirado com o auxílio de bisturi. Para a assepsia, as sementes foram imersas em solução de detergente neutro por 20 minutos (2 mL L⁻¹ de água), solução hidroalcoólica 70% (v/v) por 5 minutos, e solução de hipoclorito de sódio a 50% (v/v) por 20 minutos, seguido de triplíce lavagem com água destilada e autoclavada após cada etapa. Dada à assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio *Wood Plant Medium* (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 30% (p/v) de sacarose e 2,5% (p/v) de Gelsan® e mantidas em sala de crescimento por 90 dias. O fotoperíodo utilizado foi de 16 h de luz e 8 h de escuro com o uso de lâmpadas fluorescentes e condição luminosa de 22 μmol.m⁻².s⁻¹, assim como temperatura de 25 ± 1°C.

Para obtenção de ápices caulinares, gemas axilares foram seccionadas e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM suplementado com 30% (p/v) de sacarose, 2,5% de Gelsan® e 4,44μM de 6-Benzilaminopurina (BAP) (Sartor, Moraes & Almeida, 2012). Os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento por no mínimo 30 dias, nas mesmas condições de luminosidade e temperatura descritas anteriormente. Ápices caulinares resultantes da brotação foram seccionados para que medissem entre 3 e 5 mm. Estes foram suspensos com o auxílio de uma pipeta de Pasteur esterilizada em solução de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de alginato de sódio (p/v), 2M de glicerol, 0,4M de sacarose e

4,44μM de BAP para 1 L. Os ápices caulinares foram então dispensados em solução de meio MS suplementado com 0,1M de cloreto de cálcio, 2M de glicerol, 0,4M de sacarose, e 4,44μM de BAP para 1 L e mantidos em agitador rotativo (100 rpm) por 30 minutos para que as cápsulas atingissem 6,0 mm de diâmetro, cada cápsula contendo um ápice caulinar. Após este período as cápsulas foram retiradas da solução, lavadas em água destilada e autoclavada, para a retirada do excesso de cálcio e posteriormente imersas em solução de osmoproteção de sacarose em três concentrações diferentes (0,25ML⁻¹, 0,5ML⁻¹, e 0,75ML⁻¹). As sementes sintéticas foram mantidas sob agitação (100 rpm) por quarenta e oito horas em temperatura a 25°C ± 1°C (Wang et al., 2005).

Após a osmoproteção, o excesso de umidade das cápsulas foi retirado com o auxílio de um papel absorvente esterilizado e estas foram transferidas para placas de Petri de vidro estéril (90mm x 18 mm). Antes do início da secagem, os ápices encapsulados foram pesados em uma balança analítica para obtenção da massa fresca no tempo zero. Após a pesagem, deu-se início à secagem. As placas de Petri foram mantidas abertas em uma câmara de fluxo laminar com a temperatura ambiente de 25 ± 1°C. A perda de água das cápsulas foi monitorada, utilizando-se uma balança analítica, em intervalos regulares de uma em uma hora. Dentro de cada tratamento de osmoproteção, cada grupo de sementes sintéticas foi separado segundo o seu tratamento de desidratação o qual se constituiu de três períodos de tempo diferentes, 0 h (controle), 1 h e 2 h (Figura 1). O teor de umidade foi determinado pela diferença entre a massa fresca (MF) e a massa seca (MS) calculado de acordo com a equação: $Tu\% = [(MF - MS)/MF] \times 100\%$.

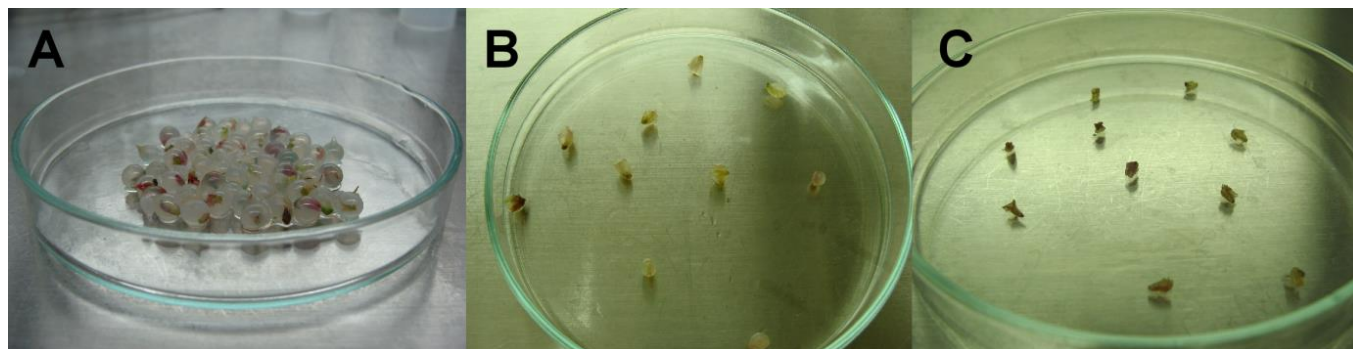


Figura 1. Ápices caulinares de *Eugênia dysenterica* submetidos ao encapsulamento-desidratação em placas de Petri 90x90mm. A: Sementes sintéticas não expostas à desidratação. B: Sementes sintéticas expostas à desidratação por uma hora. C: Sementes sintéticas expostas à desidratação por duas horas com tecidos oxidados e aparente necrose.

Uma parte das cápsulas foram adicionadas em criotubos e submetidas diretamente ao nitrogênio líquido por pelo menos 1h. A outra parte foi levada diretamente para a regeneração. As testemunhas se constituíram de cápsulas não submetidas à desidratação e cápsulas não submetidas à criopreservação. Para o descongelamento, os criotubos foram imersos em água a 40°C por dois minutos e, logo em seguida, as cápsulas foram retiradas dos criotubos e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM suplementado com 30% (p/v) de sacarose, 2,5% (p/v) de Gelsan® e 4,44μM de BAP para a regeneração. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram envolvidos em papel pardo e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz durante sete dias à 25°C e, após este período, transferidos para condições normais de crescimento (temperatura de 25 ± 1°C em condição luminosa de 22 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 horas de escuro) e avaliados após quinze dias. Os ápices caulinares foram considerados vivos ao se verificar o alongamento dos primórdios foliares.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em fatorial 3x3 (três concentrações de sacarose e três períodos de tempo de desidratação), resultando em nove tratamentos com 30 repetições. A análise dos dados foi feita por meio de estatística descritiva utilizando o *software* R versão 3.2.1 (R Core Team, 2017).

Na osmoproteção, a média do teor de água das cápsulas foi reduzida a 43,73% de umidade após uma hora e a 19,86% após duas horas de secagem. Em 40% dos ápices caulinares que foram desidratados por duas horas em câmara de fluxo laminar observou-se oxidação do tecido. Em plantastolerantes à desidratação, órgãos vegetativos podem resistir até cerca de 4% a 13% de teor relativo de água, enquanto as plantas sensíveis à desidratação morrem quando seu teor relativo de água cai abaixo de 20% a 50% (Toldi, Tuba & Scott, 2009). Assim, aparentemente os tecidos de *E. dysenterica* se caracterizam como não-tolerantes à desidratação por período superior à 1 hora.

A regeneração em ápices não criopreservados ocorreu em tratamentos com osmoproteção referente a

0,25M de sacarose Figura 2. O melhor tempo de desidratação foi de 1 h, com 55,55% de explantes regenerados. Os tempos de desidratação de 2 h e 0 h obtiveram taxas de regeneração de 23,07% e 16,66%, respectivamente. A sacarose atua como soluto compatível na proteção das macromoléculas e membranas durante a secagem, quando a água ainda está presente na massa citoplasmática, e como substituta da água quando a hidratação é perdida gradualmente. Neste último caso, interage com as proteínas e membranas através da ligação de hidrogênio impedindo, assim, a desnaturação das proteínas (Zimmerman, 1993). Este comportamento indica que a concentração 0,25M de sacarose foi eficiente na proteção da dupla camada lipídica e das proteínas durante a secagem. E que esta é, provavelmente, a concentração de sacarose necessária para a formação da camada de hidratação vítrea amorfa, responsável por impedir os rompimentos mecânicos e a desnaturação das proteínas.

Foi observado relevante índice de contaminação por microorganismos em sementes sintéticas criopreservadas e não-criopreservadas, o que variou segundo o nível de sacarose na osmoproteção, com 15% em 0,25M de sacarose, 33% com 0,5M de sacarose, e 52% com 0,75M de sacarose. Sabe-se que o glicerol é um tipo de crioprotetor utilizado também na criopreservação de microrganismos (Singh & Baghela, 2017). Assim, provavelmente os endófitos em estado de latência no tecido vegetal também foram criopreservados. Muitas vezes, para a expressão de uma característica de um microrganismo endófito, é necessário que o tecido vegetal seja submetido á stress (Arnold, 2008).

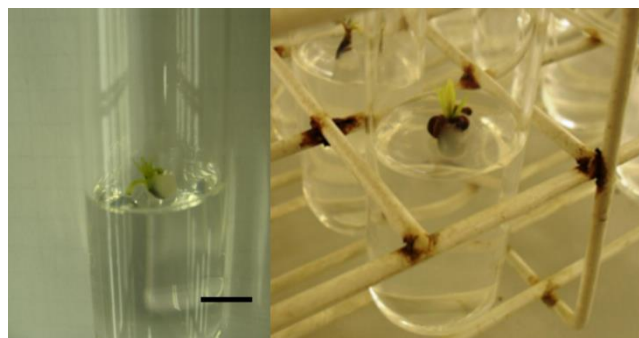


Figura 2. Regeneração de *Eugenia dysenterica* em cápsulas de alginato de cálcio e glicerol não submetidas à criopreservação em meio WPM suplementado com 4,44 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP). Ápice caulinar encapsulado com trinta dias de descongelamento. Barra=10 mm.

Não foi observada regeneração de sementes sintéticas criopreservadas. A razão para o insucesso deste e de outros casos de criopreservação está relacionado a mecanismos moleculares (Martinez-Montero & Harding, 2015). Provavelmente, a necrose no tecido foi gerada pela presença de espécies reativas de oxigênio no tecido após o estresse de congelamento, o que pode ter gerado peróxidos lipídicos, produtos aldeídicos e carbonilação de proteínas (Volk, 2010).

Mesmo não observando regeneração pós-criopreservação, o protocolo de sementes sintéticas desenvolvido no presente estudo pode ser aproveitado para o desenvolvimento futuro de protocolos que visem à manutenção a médio prazo de sementes sintéticas em baixas temperaturas, para que se possa produzir mudas a qualquer época do ano. Novas metodologias deverão ser testadas para verificar a possibilidade de obtenção de um protocolo, assim como de outras metodologias de criopreservação.

Referências

- Ahmed, M. D. R., Anis, M., & Al-Etta, H. A. (2015). Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. *Rendiconti Lincei*, 26(2), 133–139.
- Andrade, A. C. S., Cunha, R., Souza, A. F., Reis, R. B., & Almeida, K. J. (2003). Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. *Seed Science and Technology*, 31, 125–137.
- Arnold, A. E. (2008). Endophytic Fungi: Hidden Components of Tropical Community Ecology. In W. P. Carson & S. A. Schnitzer (Eds.), *Tropical Forest Community* (pp. 254–272). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Daza, L. D., Fujita, A., Granato, D., Favaro-Trindade, S. C., & Genovese, M. I. (2017). Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. *Food Bioscience*, 18, 15–21.
- Febre, J., & Dereuddre, J. (1990). Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of solanum shoot-tips. *Cryoletters*, 11, 413–426.
- Hubel, A., & Skubitz, A. P. N. (2017). Principles of cryopreservation. In P. Hainaut, J. Vaught, K. Zatloukal, & M. Pasterk (Eds.), *Biobanking of Human Biospecimens: Principles and Practice* (pp. 1–21). Cham: Springer.
- Lloyd, G. B., & McCown, B. H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society*, 30, 421–426.
- Martinez-Montero, M. E., & Harding, K. (2015). Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation. In D. Barh, M. Khan, & E. Davies (Eds.), *PlantOmics: The Omics of Plant Science* (pp. 655–682). Chicago: Springer.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- R Core Team. (2017). R. R Core Team. <http://doi.org/3-900051-14-3>.
- Sartor, F. R., Moraes, A. M. de, & Almeida, F. de A. C. (2012). Técnica de criopreservação de gemas de mangabeira. *Revista Agrotecnologia*, 3(1), 31–39.
- Shibli, R. A., Hawmdeh, F. Al, Duwayri, M., Hadidi, N., Al-Qudah, T. S., Tahtamouni, R. W., ... Zateemeh, A. (2016). Experimenting Two Cryopreservation Techniques (Vitrification and Encapsulation-Dehydration) as Approaches for Long-term Conservation of in vitro Grown Shoot Tips of Wild Fennel. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 9(3), 147–154.
- Singh, S. K., & Baghela, A. (2017). Cryopreservation of Microorganisms. In A. Varma & A. Sharma (Eds.), *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes* (pp. 321–333). Cham: Springer.
- Toldi, O., Tuba, Z., & Scott, P. (2009). Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science*, 176(2), 187–199.
- Volk, G. M. (2010). Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation. *Current Genomics*, 11(1), 24–9.
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., & Valkonen, J. P. T. (2005). Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, 24(5), 280–288.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1411–1423.