

CRIOARMAZENAGEM DE SEMENTES DE MANGA (*Mangifera indica* L.)*Mango Seed (Mangifera indica L.) Cryopreservation*

ESTHER ALBUQUERQUE

DYEGO DA COSTA SANTOS

JAIME JOSÉ DA SILVEIRA BARROS NETO

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido objetivando estudar o efeito da crioarmazenagem sobre manga (*Mangifera indica* L.), amplamente destacada pela sua importância econômica. O material clonal foi armazenado em botijões criobiológicos contendo nitrogênio líquido a -196°C e refrigerados à -15°C, por um período de 5 dias. Após a armazenagem, os embriões foram submetidos a descongelamento à temperatura ambiente (descongelamento lento) e submetidos a testes germinativos. As sementes de manga quando refrigeradas a -15°C por 5 dias em substrato de vermiculita apresentam 100% de germinação. Os embriões após refrigeração de -15°C por 15 dias e colocados em placa de petri mostraram índice de germinação de 83%. Os embriões quando crioarmazenados em nitrogênio líquido a -196°C, e colocados em placa de petri não germinaram.

PALAVRAS-CHAVE

ARMAZENAGEM. GERMINAÇÃO. MATERIAL CLONAL.

ABSTRACT

This work was developed in order to study the effect of cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.), widely highlighted by its economic importance. The clonal material was stored in cryobiological canisters containing liquid nitrogen at -196 ° C and cooled to -15 ° C, for a period of 5 days. After storage, the embryos were subjected to thawing at room temperature (slow thawing) and subjected to germination tests. The mango seeds when chilled to -15 ° C for 5 days in vermiculite substrate feature 100% germination. The embryos after cooling -15 ° C for 15 days and placed in petri dishes showed 83% germination rate. Embryos when cryostorage in liquid nitrogen at -196 ° C, and placed in a petri dish did not germinate.

KEYWORDS

STORAGE. GERMINATION. CLONAL MATERIAL.

INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma das frutas mais comercializadas em países tropicais. Originária da Índia, apresenta mais de 1000 diferentes variedades produzidas em todo o mundo além de ser considerada uma fruta nutracêutica, com varias atividades biologicas (OLIVEIRA et al., 2016).

O consumo humano possui grande apreço pela manga devido ao delicioso sabor, aroma, cor atraente e alto valor nutritivo, atributos que lhe concedeu o título de "rei dos frutos" (DAR et al., 2016).

No Brasil existem cerca de quinhentas variedades de mangas, entre as quais Costa e Santiago (2002) citam as mais conhecidas, Espada, Rosa, Haden, Keitt, Kent, Tommy Atkins, Palmer e Van Dyke.

A germinação das sementes é um processo elaborado durante o ciclo de vida e regulada por numerosos sinais intrínsecos e ambientais. É uma característica econômica e ecológica chave, sendo considerada como a fase mais crítica no ciclo de vida da planta (Holdsworth et al., 2008 e Rajjou et al., 2012). A germinação das sementes começa com a absorção de água pela semente e encerra com a ruptura do endosperma através da expansão do embrião e enfraquecimento do endosperma (CHENG et al., 2016).

A mangueira pode ser propagada pela semente e por métodos vegetativos. A propagação por semente, segundo Manica et al. (2001), é um método mais simples e seguro, pois para plantas vigorosas, com um sistema radicular abundante e profundo, têm uma maior longevidade. De acordo com o mesmo autor, na propagação de mangueira, as mudas podem ser originadas de semente, por meio de um processo que não envolve a união sexual (formadas sem a fusão de células masculinas e femininas) conhecido como poliembrionia. Essas mudas originadas do micelo, conhecidas como clone mucelares, são formadas no tecido feminino, sem a interferência do gameta masculino, e apresentam os mesmos caracteres vegetativos e reprodutivos da planta-matriz (planta que deu origem a semente).

Como processo natural, todo material biológico está sujeito ao envelhecimento; a estrutura e a função dos organismos mudam e se perdem com o tempo, até alcançar a morte. Por estas razões, desde tempos remotos se tem realizado esforços para deter o relógio biológico dos organismos e, na maioria dos casos, se buscou experimentar a manipulação da temperatura e do teor de água para lograr este propósito. As técnicas de refrigeração permitem retardar o processo de deterioração, mas a utilização de temperaturas muito mais baixas permite o armazenamento de

organismos vivos em um estado de suspensão animada por períodos extensos (ABDELNOUR, 1999; ZHENG *et al.*, 1998; PITA *et al.*, 1997).

A criopreservação é definida como a armazenagem de material biológico em um estado de repouso a temperaturas sub-zero (- 196 °C) (BENSON, 2008). Em teoria, o material vegetal pode ser preservado a temperaturas tão baixas por um período indefinido de tempo, mantendo a estabilidade genética (HARDING, 2004; WANG *et al.*, 2011).

As vantagens da criopreservação estão relacionadas com: 1) o pequeno espaço a ser ocupado por um banco de germoplasma mantido em nitrogênio líquido; 2) a simplicidade de manuseio das condições, bastando manter-se o nível de nitrogênio líquido nos botijões, reabastecendo-o a cada 40-60 dias e 3) o baixo custo do armazenamento, uma vez que não exige sistema de refrigeração nem de eletricidade (ALMEIDA, 2000).

Apesar das vantagens da criopreservação, existem problemas decorrentes da complexidade técnica e biológica do processo de congelamento e descongelamento, portanto, torna-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura agrícola (ASHWOOD-SMITH, 1985). As experiências com a criopreservação de diferentes tipos de sementes têm sido relatadas por diversos autores, sendo constatados sucessos e insucessos na criopreservação de sementes.

Weisner *et al.* (1993) pesquisou o armazenamento em nitrogênio líquido de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), onde observou-se que as sementes se apresentaram danificadas quando expostas ao L₂N. Nesse trabalho foram avaliados os efeitos de germinação, viabilidade, cotilédones quebrados, vigor e peso seco.

Stanwood *et al.* (1985) menciona que sementes de 14 espécies de legumes e 2 espécies de flores, foram colocadas em envelopes de papel e esses imersos em nitrogênio líquido por períodos de até 180 dias, não observando efeitos adversos de germinação. Nesse trabalho o mesmo autor menciona que foram testadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) sendo que essas sementes também não indicaram nenhuma redução na germinação ou no vigor após a exposição em nitrogênio líquido. Assim o autor relata que esse método é eficaz no armazenamento a longo prazo em banco de sementes.

Pense *et al.* (1991) executou um projeto para determinar a viabilidade em sementes silvestres da região de Ohio à criopreservação em nitrogênio líquido. Foram feitos um total de 527 testes em 237 espécies, tendo-se observado que 79% dos testes realizados, as sementes expostas ao nitrogênio líquido não tiveram nenhum efeito prejudicial em relação a sua germinação.

No entanto, Gonzalez-Benito et al. (1995) ao estudar a germinação de sementes de sete cultivares de Aipo (*Apium graveolens*) após o armazenamento em N₂L por um período de 30 dias, constatou que a germinação diminuiu significativamente.

O armazenamento de sementes é o método tradicional para a preservação de germoplasmas. Porém, as sementes de várias espécies de árvores são recalcitrantes, elas são sensíveis a umidade e a temperatura e, assim, não podem ser armazenadas a longo prazo de tempo.

Dessa forma, em plena mudança global, em que os ecossistemas enfrentam grandes mudanças climáticas e fortes pressões antropogênicas, a erosão e a perda de diversidade genética constituem uma realidade cada vez mais presente; assim, a conservação dos recursos genéticos se destaca como prioridade estabelecida e reconhecida em nível mundial (LOPES et al., 2013).

Este trabalho teve como objetivo geral estudar o efeito da criopreservação sobre os embriões de espécie de manga (*Mangifera indica* L.) amplamente destacada pela sua importância econômica utilizando-se temperaturas de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e temperatura ambiente (25 °C).

DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

O presente trabalho foi realizado na Universidade Estadual da Paraíba em conjunto com o Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA) da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande, PB. Foram utilizadas sementes de manga, espécie vegetal destacada pela sua importância econômica.

As sementes, retiradas do endocarpo com auxílio de uma faca previamente esterilizada, foram postas em bandejas de polietileno e refrigeradas à -15 °C durante o período de 5 dias (Figura 1). Também foram retirados os embriões com o auxílio de uma pinça e bisturi previamente esterilizados, em que foram colocados dentro de um canister e criopreservados em botijões criobiológicos a -196 °C e a -15 °C durante o período de 05 dias. Após esse período de criopreservação, os embriões e as sementes foram submetidos a descongelamento em temperatura ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, por período de 3 horas (descongelamento lento); após serem criopreservadas e descongeladas, as sementes e os embriões foram submetidos a determinação do percentual de germinação e vigor. Estes testes foram realizados seguindo-se os procedimentos contidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Para tanto foram utilizadas bandejas plásticas, contendo como substrato vermiculita esterilizada em estufa a 105°C por 3 horas. A vermiculita

foi umedecida com água destilada, sendo mantida a umidade na capacidade de campo durante todo o ensaio. Para a os embriões, estes foram transportados para placas de Petri com substrato de papel germitest. Durante o período de germinação, sempre que necessário, o substrato era regado com água destilada, mantendo-o sempre úmido. O teste de vigor foi realizado utilizando-se o teste de primeira contagem que consiste em contar o número de plânulas normais germinadas na primeira avaliação do teste padrão de germinação. Para a crioconservação, o delineamento experimental utilizado para a espécie vegetal foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 1 (2 períodos de armazenagem x 1 método de descongelamento), com quatro repetições.



Figura 1. Sementes de manga acondicionadas à refrigeração de -15 °C.

Analisando-se os dados contidos na Tabela I, constata-se que as sementes de manga obtiveram potencial germinativo elevado depois de serem submetidas à crioarmazenagem (Figura 2).

Tabela I. Valores de germinação e vigor das sementes de manga, sem o tegumento, depois de serem submetidas à crioarmazenagem

PARCELA I	PARCELA 2
24,4 cm	20,5 cm
21,5 cm	17,5 cm
29 cm	30,6 cm
27,7 cm	18,7 cm
17,5 cm	15,3 cm



Figura 2 – Sementes de manga germinadas em vermiculita

Na Tabela 2, são identificados os valores médios representativos dos testes de germinação e vigor dos embriões quando submetidos a técnica de refrigeração em -15°C por um período de 5 dias.

Tabela 2. Valores de germinação e vigor dos embriões das sementes de manga depois de submetidas à criopreservação em temperatura de -15°C por um período de 5 dias.

PARCELA I	PARCELA 2	PARCELA 3
17 cm	13 cm	10,3 cm
6,5 cm	9,5 cm	11,2 cm
7,3 cm	7,2 cm	12,4 cm
Não germinou	Não germinou	12,5 cm

Verifica-se na Tabela 2 que as germinações dos embriões de manga, depois de submetidas a refrigeração por 5 dias de armazenamento obtiveram condições significativas de germinação (Figura 3). Algumas, entretanto não germinaram, provavelmente na refrigeração o tempo de descongelamento pode estar interferindo no resultado, pois o embrião como um todo, ou seja, no seu interior, pode não ter atingido a temperatura ambiente, o que poderia retardar seu desenvolvimento.



Figura 3 – embriões de manga germinados à -15°C

São raros na literatura trabalhos científicos que tratem de crioarmazenagem de embriões e muito menos de embriões de sementes de manga. Entretanto, sabe-se que o armazenamento de sementes é o método tradicional para a preservação de germoplasmas. Porém, sementes de várias espécies de árvores são recalcitrantes, revelando sensibilidade acentuada à perda de água, e, assim, não podem ser armazenadas por longo prazo de tempo.

Roberts (1973), introduziu o termo ortodoxas para espécies cujas sementes podem ser submetidas a secagem e após armazenadas a baixas temperaturas, permanecendo viáveis por longo período de tempo. Existem ainda as sementes recalcitrantes que perdem a viabilidade quando desidratadas, dificultando sua conservação.

Segundo Batista (2000), a criopreservação das sementes é uma técnica onde são utilizadas temperaturas muito baixas de modo a reduzir ou inibir completamente o metabolismo degenerativo em células de plantas e como resultado, as sementes armazenadas podem ser preservadas indefinidamente. Assim como consequência, o armazenamento criogênico seria, em teoria, o procedimento ideal para conservação do patrimônio fitogenético das espécies por longos períodos de tempo. Contudo, nem todas as espécies toleram temperaturas baixas na sua preservação.

Com relação aos embriões armazenados em nitrogênio líquido a -196 °C e crioprotetidos em tubo de polietileno, estes perderam seu poder germinativo. Isso indica que para determinados tipos de material vegetal existe um teor de umidade limite na qual eles toleram a criopreservação. Esse fato foi comprovado por Diniz (1999), onde afirma que o teor de umidade limite para criopreservação de sementes de milho (*Zea mays* L.) está em torno de 9%, depois de submeter essas 3 variedades em nitrogênio líquido a -196°C por período de 3 dias.

Munford (1979) estudou sementes de limão com baixos teores de umidade e sementes recém colhidas. As sementes recém colhidas morreram através da imersão em nitrogênio líquido.

Touchell e Dixon (1994) alertam que, em geral, um incremento no teor de água da semente resulta em um declínio na viabilidade e no vigor após a imersão em nitrogênio líquido ou à exposição ao vapor de nitrogênio. Para justificar tal afirmativa, os autores, trabalharam com várias espécies da flora australiana, entre estas, *Loxocarya gigas*, que apresentando um teor de água de aproximadamente 12%, após a imersão em nitrogênio líquido, não houve germinação de nenhuma semente. Já para sementes de *Jacksonia floribunda*, que com um teor de água em torno de 7,5%, observou-se uma alta germinação, chegando a mais de 85%. Os autores constataram assim uma tendência geral entre o declínio do teor de água das sementes e uma sobrevivência crescente, em termos de germinação.

Em última análise, pôde-se auferir que a inviabilidade dos embriões que se verificou após a crioarmazenagem em nitrogênio líquido deu-se provavelmente em virtude de terem sido armazenados com alto teor de umidade, considerando-se que os mesmos foram excisados das sementes sem passar pelo processo de secagem, ou seja, de sementes recém colhidas. Em se tratando de embriões e, portanto, formados de tecidos muito jovens, identificam sensibilidade acentuada à perda de água, ou seja, são intolerantes à desidratação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que as sementes de manga quando submetidas à refrigeração de armazenamento apresentam índice de germinação e vigor elevados. Os embriões de manga depois de submetidos à refrigeração apresentaram índices de germinação e vigor menores que os obtidos para as sementes. Embriões excisados de sementes que não passaram pelo processo de secagem e submetidos à crioarmazenagem não germinaram.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A.C.; VILLAMIL, J.M.P. GOUVEIA, J. P. G.. Efecto de La crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.2., n.1, p.67-71, 2000.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Genetic damage is not produced by normal criopreservation involving either glycerol or demethyl sulfoxide: a cautionary note, however, on possible effects of dymethyl sulfoxide. Cryobiology, v.22, 1985, .427-433.
- BATISTA, R.C. Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Campina Grande: DEAg/CCT/UFPB, 2000, 83p. Dissertação Mestrado.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

- COSTA, J.G; SANTIAGO, C.A.F. Principais cultivares de manga para as condições do Vale do São Francisco. Embrapa Semi-Árida – Sistema de produção. ISSN 1807-0027 versão eletrônica, 2002.
- DAR, M. S.; OAK, P.; Chidley, H.; DESHPANDE, A.; GIRI, A.; Nutrient and flavor content of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars: an appurtenance to the list of staple foods. Nutritional Composition of Fruit Cultivars, p.445-467, 2016.
- DINIZ, P. S. C. Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de criopreservação. 1999, 80p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Agrícola).
- GONZALEZ-BENITO, M.E.; IRIONDO, J.M.; PITA, J.M.; PEREZ-GARCIA, F. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. Madrid, Spain.: Universidade Politécnica de Madrid, Hort Science v.75, p.1-4, 1995.
- LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. A. C.; CARVALHO, J. M. F. C.; BRUNO, R. L. A. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.17, n.3, p.291-298, 2013.
- MANICA, I.; MALAVOLTA, E.; ICUMA, I.M.; CUNHA, M.M.; JUNIOR, E.O.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RAMOS, V.H.V. *MANGA: Tecnologia, Produção, Pós-colheita, Agroindústria e Exportação*. Porto Alegre: Cinco Continentes editora LTDA, 2001.
- OLIVEIRA, B. G.; COSTA, H. B.; VENTURA, J. A.; KONDRATYUK, T. P.; BARROSO, M. E. S.; Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). Food Chemistry, v.204, p.37-45, 2016.
- PENSE, V. C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. University Ciccinnati: Center for Reproduction of Endangered Wildlife, Ciccinnati Zoo and Botanical Garden, v.19, p.235-251, 1991.
- PITA, J.M.; BARRERO, S.; ESCUDERO, A. Cryopreservation: na alternative method for the conservation of endangered populations of two iberian pines (*Pinus nigra* ARNOLD and *Pinus sylvestris* L.). Silvae Genetica, Frankfurt, Germany, v. 46, n.4, p.250-252, 1997.
- STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: Kartha, K.K. (ed.). Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Rotan: CRC Press, p.199-225, 1985.
- WEISNER, L. E.; LAUFMANN, J. E.; STANWOOD, P. C.; WHEELER, L. J. The effect of liquid nitrogen on alfa seed viabilit, emergence and broken cotyledons. Journal of Seed Technology, v.18, n.1, 1993.
- ZHENG, G.H.; JING, X.M.; TAO, K.L. Ultradry seed storage cuts cost of gene bank. Nature, London, v.393, p. 223-224, 1998.

Esther Albuquerque

Graduada em Ciências Biológicas pela UEPB, Mestre em Engenharia Agrícola e Doutora em Engenharia de Processos pela UFCG. Professora. E-mail: esther_barros@hotmail.com

Dyego da Costa Santos

Possui graduação em Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Centro de Ensino Tecnológico (2008), especialização em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (2012), na área de concentração em Tecnologia de Frutas e Hortaliças, mestrado (2012) e doutorado (2016) em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Campina Grande, na área de concentração em Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Ciência de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: controle de qualidade, secagem, processamento e armazenamento de produtos agrícolas.

Jaime José Barros da Silveira Neto

Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico nas áreas de Turismo, Hospitalidade e Lazer no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe. Doutor em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande - PB (2011) (CAPES 5); Mestre em Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande - PB (2009) (CAPES 5); Especialista em Ecoturismo: Interpretação e planejamento de atividades em áreas naturais, Universidade Federal de Lavras - MG (2009); Bacharel em Turismo com Habilitação em Planejamento e Organização do Turismo, Universidade Federal da Paraíba - PB (2003).

RECEBIDO EM 20/02/2016
APROVADO EM 08/04/2016