



Teor de prolina em brotações adventícias de mangabeira cultivadas *in vitro* sob condições de estresse osmótico

Proline *in vitro* on mangaba adventitious shoots under osmotic stress

M. C. SANTOS¹; B. T. CARDOSO²; K. K. P. GOMES-COPELAND³; A. V. C. SILVA²; SILVA JUNIOR, J. F. ²; A. S. LÉDO^{2*}

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Sergipe, CEP, São Cristovão-Sergipe, Brasil

²Área Técnico-Científica, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 49025040, Aracaju-Sergipe, Brasil

³Renorbio, Universidade Federal da Bahia, 49025040, Salvador-Bahia, Brasil

*ana.ledo@embrapa.br

(Recebido em 13 de junho de 2016; aceito em 05 de dezembro de 2016)

A conservação de plantas *ex situ* com a aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas se baseia na manutenção de coleções em laboratório por crescimento lento ou criopreservação. O sorbitol tem sido recomendado para indução de estresse hídrico com a finalidade de induzir crescimento lento em culturas de mangaba *in vitro* possibilitando a sua conservação. O objetivo do trabalho foi de quantificar a prolina em segmentos nodais e foliares de mangabeira submetidas a diferentes condições de estresse osmótico para fins de conservação por crescimento lento. Microestacas contendo dois segmentos nodais e quatro folhas foram inoculados em tubos de ensaio (35 mm x 127 mm) com tampa plástica contendo 25 mL de meio de cultura de MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético (AIA), 1 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 30 g.L⁻¹ de sacarose e gelificado com 3 g.L⁻¹ de Phytigel®. Foram avaliadas diferentes concentrações de sorbitol (0;10; 20 e 40 g.L⁻¹). Aos 30 dias após a inoculação foi realizada a quantificação da prolina em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa fresca de segmentos foliar e caulinar. O maior acúmulo de prolina foi detectado em segmentos caulinares (6,37 $\mu\text{mol de prolina.g}^{-1}$ massa fresca) em comparação com segmentos foliares (2,60 $\mu\text{mol de prolina.g}^{-1}$ massa fresca). Não houve efeito significativo do sorbitol e sua interação com tipo de segmento para o teor de prolina. A presença de prolina mesmo na ausência do sorbitol pode indicar possível ajustamento osmótico natural.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*, conservação *ex situ*, cultura de tecidos

The *ex situ* conservation of plants from the tissue culture technique is based on the laboratory collections by slow growth or cryopreservation. Sorbitol has been recommended to water stress induction with the purpose of inducing a slow growth in mangaba *in vitro* cultures. The objective was to quantify proline in nodal and foliar segments of mangaba under different conditions of osmotic stress for conservation purposes by slow growth. Microcutting containing two nodal segments and four leaves were inoculated in test tubes (35 mm x 127 mm) with plastic cap containing 25 ml of MS medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ indole acetic acid (IAA), 1 mg.L⁻¹ benzylaminopurine (BAP), 30 g.L⁻¹ sucrose and gelled with 3 g.L⁻¹ Phytigel®. Sorbitol was evaluated on different concentrations (0, 10, 20 and 40 g.L⁻¹). At 30 days after inoculation were quantified proline in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ fresh weight of leaf and stem segments. The most proline accumulation was detected in stem segments (6.37 $\mu\text{mol of prolina.g}^{-1}$ fresh weight) as compared to leaf segments (2.60 $\mu\text{mol of prolina.g}^{-1}$ fresh weight). There was no significant effect of sorbitol and its interaction with type of segments on the proline content. The presence of proline even in the absence of sorbitol may indicate a possible natural osmotic adjustment of mangaba.

Keywords: *Hancornia speciosa*, *ex situ* conservation, tissue culture

1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera tropical nativa, tem ocorrência nos tabuleiros costeiros, baixada litorânea e cerrados do Brasil [1, 2]. Constitui uma das mais importantes matérias-primas para produção de sucos, comércio de polpas congeladas, sorvetes, doces, geleias, além da fabricação de vinhos licores e vinagres por sua eficiência de digestibilidade e valor nutritivo [3, 4]. A mangabeira tem apresentado alto risco de erosão genética [5] devido a alta especulação imobiliária nas áreas de ocorrência natural como a baixada litorânea.

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas para a conservação *in vitro* por meio da redução e/ou supressão do crescimento tem sido importante como método complementar à conservação de germoplasma em campo [6]. O desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* para mangabeira torna-se imperativo como alternativa a conservação de campo, tendo em vista a limitação de conservação de suas sementes que são recalcitrantes [7]. Publicações a cerca da conservação *ex situ* com técnicas de culturas de plantas de espécies tropicais e o desempenho das plantas conservadas na fase de retomada do crescimento são escassas. Alguns resultados publicados recentemente indicam a possibilidade de conservação de explantes de mangabeira por crescimento lento com o uso de reguladores osmóticos (manitol e sorbitol) [8, 9] e reguladores de crescimento como o ácido abscísico [9].

Diversos trabalhos relatam a prolina como marcador bioquímico em culturas *in vitro* submetidas a diferentes condições de estresse para acerola [10], bromélias [14], cana-de-açúcar [15, 16] e feijão [17]. Esse aminoácido, presente em pequenas quantidades nas plantas tem sua concentração elevada sob condições de estresse, permitindo a osmoproteção celular como tampão prevenindo efeitos deletérios nas membranas e preservando a integridade de compostos como proteínas e enzimas [10, 11, 12, 13].

O objetivo do trabalho foi quantificar a prolina em amostras de segmentos caulinares e foliares de microestacas de mangabeira cultivadas *in vitro* em diferentes condições de estresse osmótico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros no estágio VI de população nativa de mangabeira da Fazenda Caju, Campo Experimental de Itaporanga, SE foram processados manualmente para extração de sementes com auxílio de peneira e sucessivas lavagens.

As sementes foram submetidas à limpeza em solução detergente comercial (duas gotas 100 mL⁻¹ de água) seguida da lavagem em água destilada. Em câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em solução microfiltrada de antibiótico rifampicina 300 mg.L⁻¹ por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril. Em seguida foram desinfestadas com álcool etílico 70% por 10 segundos; solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada estéril. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog [18]) com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 3 g.L⁻¹ de Phytigel®. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, microestacas contendo dois segmentos nodais e quatro folhas foram obtidas das plântulas germinadas *in vitro* e inoculadas em tubos de ensaio (35 mm x 127 mm) com tampa plástica contendo 25 mL de meio MS com 1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético (AIA), 1 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 30 g.L⁻¹ de sacarose e 3 g.L⁻¹ de Phytigel®. Para a redução do crescimento quatro concentrações de sorbitol (0; 10; 20 e 40 g.L⁻¹) foram testadas. Em seguida o pH foi ajustado para 5,8 e os tubos de ensaio contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C, sob pressão 1,05 kg.cm⁻² por 15 minutos. Após a inoculação as culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas (52 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância) e temperatura de 27 ± 1°C.

A quantificação da prolina em µmol.g⁻¹ de massa fresca de segmentos foliar e caulinar foi obtida aos 30 dias de cultura pelo método de Bates [19] modificado, o qual foi realizado por meio das seguintes etapas: obtenção de um extrato a partir da massa fresca das folhas e entre-nós (aproximadamente 0,2 g) com ácido 5-sulfosalicílico a 3% (10 mL) em almofariz; separação do sobrenadante por precipitação do material vegetal insolúvel em centrífuga (670 g por 15 minutos); obtenção do cromóforo por meio da reação da prolina contida no sobrenadante com ninidrina ácida a quente (2 mL do extrato + 2 mL de ninidrina ácida + 2 mL de ácido acético glacial em banho-maria a 100°C durante 1 hora); partição da prolina da fase aquosa para a fase orgânica pela adição de 4 mL de tolueno a 2 mL do sobrenadante seguida de agitação por 20 segundos; Leitura da absorbância das amostras utilizando espectroscopia molecular na região visível (520 nm). A curva de calibração foi desenvolvida utilizando-se solução estoque de prolina P.A. na concentração de 100 µmol.L⁻¹ e diluições com água destilada. A concentração de prolina obtida pela inserção das absorbâncias das amostras na curva de calibração foi utilizada para o cálculo dos teores de prolina das amostras, expressos em µmol de prolina.g⁻¹ de amostra fresca,

por meio da equação: $C_{\text{Prolina}} \times V_{\text{Tolueno}} \times 5 / m_{\text{Amostra}} =$, onde C_{Prolina} = Concentração de prolina na fase tolueno em ($\mu\text{mol. L}^{-1}$), V_{Tolueno} = Volume de tolueno em L, m_{Amostra} = Massa de amostra utilizada em g.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado 2 x 4 (dois tipos de segmentos combinado com quatro concentrações de sorbitol), totalizando oito tratamentos com três repetições. As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância por meio do programa estatístico SISVAR [20].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do tipo de segmento na concentração de prolina (Tabela 1). O maior acúmulo de prolina foi detectado em segmentos caulinares ($6,37 \mu\text{mol}$ de prolina. g^{-1} de massa fresca) em comparação com segmentos foliares ($2,60 \mu\text{mol}$ de prolina. g^{-1} de massa fresca) (Tabela 2).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para concentração de prolina em função do tipo de segmento e da concentração de sorbitol em culturas *in vitro* de mangabeira.

FV	GL	QM	F
Sorbitol (S)	3	2,66	1,43ns
Tipo de segmento (T)	1	85,09	45,95**
S*T	3	3,59	1,94ns
erro	16	1,85	
CV (%)	30,33		

Ns não significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

Resultados similares foram obtidos anteriormente por Santos [21] onde folhas de microestacas de mangabeira apresentaram menor teor de prolina comparado com segmentos caulinares. Este resultado indica que em condições de estresse osmótico a prolina é metabolizada e acumulada em maior quantidade no caule de culturas *in vitro* de mangabeira. Entretanto, Potluri Sasikaka & Devi Prasad [22] estudando 10 cultivares de batatas submetidas a estresse observaram menor acúmulo de prolina em segmentos caulinares.

Tabela 2. Teor de prolina (μmol de prolina. g^{-1} massa fresca) em segmentos foliares e caulinares de microestacas de mangabeira em diferentes concentrações de sorbitol.

Tipo de segmento	Sorbitol (g.L^{-1})				Média
	0	10	20	40	
Caulinar	5,86Aa	5,99Aa	5,29Aa	8,34Aa	6,37a
Foliar	1,97Aa	3,17Aa	2,83Aa	2,44 Aa	2,60b
Média	3,92A	4,58A	4,06A	5,39A	

médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Não houve efeitos significativos da concentração do sorbitol e sua interação com tipo de amostras para o teor de prolina. Estes resultados não concordam com Cárdenas-Avila et al. [17], em calos oriundos de folhas cotiledonares de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O teor de prolina aumentou com a redução do potencial hídrico em cultivares tolerantes. As concentrações utilizadas de sorbitol podem ter sido baixas para induzir um aumento na síntese de prolina nas amostras estudadas, apesar de serem suficientes para induzir a redução do crescimento *in vitro* [9]. Outro aspecto a ser abordado é a presença de prolina mesmo na ausência do sorbitol, indicando um possível ajustamento osmótico natural do genótipo de mangabeira alvo de estudo.

Errabii et al. [23] em estudos com estresses salino e hídrico em cultivares de cana-de-açúcar, planta C₄, observaram que o aumento na concentração de prolina seria mais uma injúria do que

um marcador de resistência ao estresse hídrico em comparação ao estresse salino. Outros autores sugerem que a síntese desse aminoácido pode ser um indicador de tolerância adquirida, pelo fato do maior acúmulo em genótipos tolerantes do que em não adaptados a condições de estresse [24]. Estudos posteriores deverão ser conduzidos comparando diferentes genótipos de mangabeira para a indicação ou não da prolina como marcador fisiológico para o *screening* de recursos genéticos de mangabeira tolerantes a estresse osmótico.

4. CONCLUSÃO

Ocorre maior acúmulo de prolina em segmentos caulinares de brotações adventícias de mangabeira cultivadas *in vitro*.

O aumento da concentração de sorbitol não induz aumento na síntese de prolina em segmentos caulinares e foliares de mangabeira cultivadas *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva Junior JF, Ledo AS. Botânica. In: Silva Junior, JF; Ledo, AS. (Ed) A cultura da mangaba. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2006. p.25-33.
2. Monachino JA. A revision of Hancornia (Apocynaceae). Lilloa: Tucumán, v. 11, 1945. p. 19-48.
3. Lederman IE, Silva Júnior JF, Bezerra JEF, Espíndola ACM. Mangaba (Hancornia speciosa Gomes). Jaboticabal: Ed. São Paulo, 2000. 35 p. (Série frutas nativas, 2).
4. Aloufa MAI. Multiplicação e conservação *in vitro* de mangabeira. Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 1., 2003, Aracaju, SE. Simpósio Brasileiro sobre a Cultura da Mangaba, 2003; Aracaju, Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2003.
5. Lemos RP, Alves EF, Silva H. Características pomológicas de mangabeira (Hancornia speciosa Gomez) da Paraíba, Congresso Brasileiro de Fruticultura, 10, Fortaleza, 1989. Anais... Fortaleza: SBF; 1989, p.346-351.
6. George EF. Plant propagation by tissue culture. 2. ed. London: Exegetics, 1993.
7. Carvalho JEU de, Müller CH, Nascimento WMO do. Classificação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia de acordo com o comportamento no armazenamento. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 4 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 60)
8. Sa AJ, Ledo AS, Ledo CAS. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. Cienc. Rural 2011; 41: 57-62, doi: 10.1590/S0103-84782011000100010
9. Santos M da C, Ledo AS, Ledo CAS, Souza FVD, Silva Junior JF. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. Rev. Ciên. Agron. 2011; 42: 735-741, doi: 10.1590/S1806-66902011000300020
10. Nogueira RJMC, Moraes JAP, Burity HA, Bezerra Neto E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. R. Bras. Fisiol. Veg. 2001; 13(1): 755-787.
11. Marin A. Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial de guandu (cajanus cajan (L.) Millsp). 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003
12. Giannakoula A, Moustakas M, Mylona P, Papadakis I, Yupsanis T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and al accumulation. J. Plant Physiol. 2008; 165(4):385-396. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.014.
13. Abdul Jaleel C, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, Paneerselvam R. Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in Catharanthus roseus exposed to water deficit. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007; 59(2): 150-157.
14. Braga VF, Pereira PF, Silva CJ, Vale VF, Bianchetti RE, Forzza RC, Ribeiro C, Peixoto PHP. Proline levels, oxidative metabolism and photosynthetic pigments during *in vitro* growth and acclimatization of Pitcairnia encholirioides L.B. Sm. (Bromeliaceae). Braz. J. Biol. 2016 Feb; 76(1): 218-227. doi: 10.1590/1519-6984.19314.
15. Medeiros MJL, De A. Silva MM, Granja MMC, De Souza e Silva Júnior G, Camara T, Willadino L. Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown *in vitro* under salt stress. Acta Biol.Colomb. 2015; 20(2): 57-63. doi:0.15446/abc.v20n2.42830

16. Watanabe S, Kojima KIY, Sasaki S. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2000; 63:199–206.
17. Cardenas-Avila, ML et al. Variability in accumulation of free proline on in vitro calli of four bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties exposed to salinity and induced moisture stress. *Phyton* 2006, 75: 103-108.
18. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473-497.
19. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 1973; 39: 205-207.
20. Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 2011; 35(6): p.1039-104. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001
21. Santos M da C., Ledo AS, Ledo CAS, Souza FVD, Silva Junior JF. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. *Rev. Ciên. Agron.* , 2011; 42: 735-741.
22. Potluri Sasikala DP, Devi Prasad PV. Salinity effects on in vitro performance of some cultivars of potato. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 1994; 6(1):1-6.
23. Errabii T, Gandonou CB, Essalmani H, Abrini J, Idaomar M, Senhaji NS. Effect of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiol. Plant.*, 2007; 29: 95-102. doi: 0.1007/s11738-006-0006-1
24. Bellinger Y, Bensaoud A., Larher F. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: Acevedo E, Conesa AP, Srivastava JP. (Eds.) *Physiology- breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments*. INRA, 449-458. 1991.