

Respostas de ápices caulinares de *Hancornia speciosa* à criopreservação**Responses of *Hancornia speciosa* shoot tips to cryopreservation****Respuestas de las yemas caulinares de *Hancornia speciosa* a la
crioconservación**

DOI: 10.34188/bjaerv8n3-086

Submetido: 30-05-2025

Aprovado: 15-06-2025

Anna Beatriz Nogueira de Araújo

Mestrado em Agricultura e Biodiversidade
Universidade Federal de Sergipe
São Cristóvão, SE. Brasil
E-mail: abnogueira.engagro@gmail.com

Gilmara da Silva Freire

Doutorado em Agricultura e Biodiversidade
Universidade Federal de Sergipe
São Cristóvão, SE. Brasil
E-mail: gilfreire21@hotmail.com

Annie Carolina Araújo de Oliveira

Doutorado em Agricultura e Biodiversidade
Universidade Federal de Sergipe
São Cristóvão, SE. Brasil
E-mail: anniedeoliveira@hotmail.com

Nátaly Luzia Jorge

Graduação em Engenharia Agrícola
Universidade Federal de Sergipe
São Cristóvão, SE. Brasil
E-mail: nataly.jorge@icloud.com

Ana Veruska Cruz da Silva

Doutorado em Produção Vegetal
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE. Brasil
E-mail: ana.veruska@embrapa.br

Juliana Lopes de Sousa

Doutorado em Agricultura e Biodiversidade
Embrapa Tabuleiros Costeiros/CNPQ
Aracaju, SE. Brasil
E-mail: juliana_lopes_souza@live.com

Ana da Silva Léo
Doutorado em Fitotecnia
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE. Brasil
E-mail: ana.ledo@embrapa.br

RESUMO

A *Hancornia speciosa* é uma espécie nativa do Brasil, valorizada por seus frutos e propriedades medicinais. Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta do acesso Água Boa à técnica de vitrificação em 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 min), 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 a formação de cristais de gelo. Agentes crioprotetores sintéticos, como DMSO e glicerol, são essenciais para proteger as células durante a criopreservação, apesar de sua 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-chave: mangaba, criopreservação, crioprotetor, recursos genéticos.

ABSTRACT

Hancornia speciosa (mangaba) is a species 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 min), 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: mangaba, cryopreservation, cryoprotector, genetic resources.

RESUMEN

La *Hancornia speciosa* es una especie nativa de Brasil, apreciada por sus frutos y propiedades medicinales. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de la variedad Água Boa a la técnica de vitrificación en gotas, con el fin de establecer un protocolo de conservación ex situ complementario para el Banco Activo de Germoplasma (BAG) Mangaba de Embrapa Tabuleiros Costeiros. El experimento se realizó en un diseño aleatorio, con tres tratamientos que variaban los tiempos de exposición a la solución PVS2 (10, 20 y 30 min) y siete repeticiones por tratamiento. El grupo de control incluyó ápices caulinares no expuestos al nitrógeno líquido, solo inmersos en PVS2. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en la regeneración de los ápices no expuestos al nitrógeno líquido, independientemente del tiempo de exposición a la solución PVS2, lo que sugiere un patrón lineal negativo. En el caso de los ápices expuestos al PVS2 y crioconservados en nitrógeno líquido, no se observó un efecto significativo en la regeneración tras 30 días de cultivo, pero se produjo una reducción de la viabilidad al aumentar el tiempo de exposición. La mayor inviabilidad de los explantes puede atribuirse al daño celular durante el recalentamiento posterior a la crioconservación, debido a las temperaturas extremadamente bajas y a la formación de cristales de hielo. Los agentes crioprotectores sintéticos, como el DMSO y el glicerol, son esenciales para proteger las células durante la crioconservación, a pesar de su potencial toxicidad. Las estrategias que combinan diferentes agentes, incluidos los antioxidantes, son cruciales para mitigar estos efectos adversos y mejorar la eficacia del proceso de conservación.

Palabras clave: mangaba, crioconservación, crioprotector, recursos genéticos.

1 INTRODUÇÃO

Hancornia speciosa Gomes, conhecida popularmente como mangaba ou mangabeira, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, amplamente valorizada tanto pelo sabor característico de seus frutos quanto pelas suas propriedades medicinais (Silva Junior, 2004). A mangabeira pertence à família Apocynaceae e está distribuída em diversas regiões do país, especialmente no Nordeste, onde ocorre desde os Tabuleiros Costeiros até as Baixadas Litorâneas, prosperando em solos profundos, pobres e arenosos (Silva Junior *et al.*, 2018).

A espécie possui relevância cultural e econômica, sendo apreciada para consumo in natura e como matéria-prima na indústria alimentícia, especialmente na produção de sucos e sorvetes, o que contribui significativamente para a economia local (Paula *et al.*, 2019; Nunes *et al.*, 2022). Além disso, extratos da planta têm amplo uso na medicina tradicional. Entretanto, a mangabeira enfrenta ameaças em seu habitat natural em decorrência da urbanização e degradação ambiental, evidenciando a necessidade urgente de estratégias eficazes para conservação de sua diversidade genética (Santos *et al.*, 2015).

A conservação de plantas in vitro consiste na manutenção de coleções biológicas em ambientes assépticos por meio da cultura de tecidos, técnica que possibilita o armazenamento do germoplasma em condições livres de patógenos (Faria *et al.*, 2006). Dentre as metodologias disponíveis, destaca-se a criopreservação, que permite a conservação em longo prazo de explantes

vegetais em temperaturas extremamente baixas, geralmente a -196°C em nitrogênio líquido (Panis *et al.*, 2001; Sartor *et al.*, 2012), Costa *et al.* citado por (Castro *et al.*, 2020). Esse processo interrompe o metabolismo celular e a multiplicação das plantas, viabilizando a criação de bancos de germoplasma altamente eficientes em termos de espaço e custo (Nascimento *et al.*, 2020). Embora a mangabeira seja considerada uma espécie recalcitrante, protocolos de criopreservação têm sido bem-sucedidos em outras espécies, como calos embriogênicos de manga (Wu *et al.*, 2007) e embriões somáticos de cacau (Adu-Gyamfi; Wetten, 2012).

A técnica de vitrificação em gotas tem sido amplamente empregada na criopreservação de tecidos vegetais. Nessa abordagem, os explantes são imersos em soluções crioprotetoras compostas por agentes como dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, capazes de proteger as células contra danos provocados pelo congelamento (Hammond *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023). O rápido resfriamento dessas soluções transforma a água intracelular em uma fase vítrea amorfa, impedindo a formação de cristais de gelo que poderiam lesionar as membranas celulares (Panis *et al.*, 2005; Panis; Lamberti, 2005). Essas soluções crioprotetoras atuam também na redução do teor de água dos tecidos vegetais antes da imersão em nitrogênio líquido. Vale ressaltar que o desempenho dos crioprotetores pode variar de acordo com seus componentes, visto que alguns apresentam a capacidade de penetrar nas membranas celulares, enquanto outros atuam apenas externamente (Panis *et al.*, 2005; Panis; Lambardi, 2005).

A criopreservação, sobretudo em espécies tropicais frutíferas, demanda protocolos específicos, considerando as particularidades fisiológicas e bioquímicas de cada espécie (Santos; Salomão, 2023). Essa técnica representa um avanço importante na conservação da biodiversidade vegetal, ao possibilitar o armazenamento seguro do germoplasma sem perda significativa de viabilidade (Faltus *et al.*, 2021).

Em um estudo de criopreservação de ápices caulinares de mangabeira por meio da técnica de vitrificação em gotas, os explantes foram expostos à solução de vitrificação vegetal 2 (PVS2) antes da imersão em nitrogênio líquido. Os autores observaram que a técnica permitiu a criopreservação dos ápices caulinares (Santana *et al.*, 2022), após crioproteção com PVS2 por 30 e 50 min, mas com alta porcentagem de oxidação dos explantes. Ajustes no tempo de imersão em solução crioprotetora e concentrações dos componentes do meio pós-cultura podem otimizar as taxas de regeneração. Santos *et al.* (2015) observaram que a pré-cultura em meio MS suplementado com 0,3 M de sacarose aumentou significativamente a sobrevivência dos explantes de mangabeira criopreservados.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta do acesso Água Boa à técnica de vitrificação em gotas com PVS2 em menor tempo de exposição, visando estabelecer um

protocolo de conservação ex situ complementar para os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba (BAG Mangaba) da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

2 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe. Utilizaram-se sementes do acesso de mangabeira Água Boa (AB), provenientes do BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, para obtenção de plântulas germinadas in vitro. Os frutos foram despulpados sem água corrente, com auxílio de peneira, e as sementes lavadas em água estéril contendo Tween-20. Posteriormente, foram deixadas para secar a temperatura ambiente sobre bandejas forradas com papel absorvente por 24 h (Figura 1A). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por imersão em etanol 70% (v/v) durante 5 min, seguida de hipoclorito de sódio a 2% por 20 min (Figura 1B), sendo então enxaguadas três vezes com água destilada estéril, conforme Lédo (2007), (Figura 1C).

As sementes foram inoculadas na posição horizontal, em grupos de três a quatro, em meio de cultura MS, suplementado com 40 g/L de sacarose e solidificado com 5 g/L de Phytigel™. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e autoclavado a 121 ± 1 °C, durante 15 minutos, sob pressão de 1,05 atm. As culturas permaneceram em condições controladas, com temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de aproximadamente 70%, fotoperíodo de 12 h e irradiância de $52 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, por até 150 dias após a germinação.

Figura 1. Assepsia de sementes de mangaba do acesso AB (Água Boa). A- Sementes lavadas e secas por 24 h em temperatura ambiente. B- Imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 20 min na câmara de fluxo laminar. C- Sementes assépticas. Fonte: Elaborado pelos autores (2025).



Ápices caulinares com aproximadamente 1,0 mm² foram excisados das plântulas in vitro e submetidos a pré-cultivo em placas de Petri estéreis contendo meio WPM, suplementado com 0,625 M de sacarose e solidificado com 5 g/L de Phytigel™. As culturas permaneceram em ambiente escuro, sob temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente 70%, durante 24 h.

Após o pré-cultivo, os ápices caulinares foram imersos em solução de carregamento composta por 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose dissolvidos em meio MS, à temperatura ambiente, por 20 min. A técnica de vitrificação em gotas foi conduzida conforme descrito por Santos *et al.* (2015) e Santana *et al.* (2022). Cada explante foi envolto em uma gota de 0,25 mL da solução PVS2, composta por 0,4 M de sacarose, 30% de glicerol, 15% de etilenoglicol e 15% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sakai *et al.*, 1990), disposta sobre placas de alumínio (150 × 5 mm) mantidas a 0 °C, por 10, 20 ou 30 min (5 gotas por placa).

Após cada tempo de exposição ao PVS2, placas contendo as gotas com os explantes foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido (-196 °C), transferidas para criotubos e armazenadas por 24 h em tambor de nitrogênio líquido.

Os ápices caulinares foram reaquecidos em solução de descarregamento, composta por meio MS suplementado com 1,2 M de sacarose, à temperatura ambiente (27 ± 2 °C), durante 15 minutos. Em seguida, foram transferidos para meio de regeneração WPM, suplementado com 0,09 M de sacarose, 0,002 g/L de BAP, 0,02 g/L de ácido ascórbico e 3 g/L de Phytigel™. As culturas permaneceram no escuro por seis dias, sendo posteriormente transferidas para ambiente com temperatura controlada de 27±2 °C, umidade relativa em torno de 70%, fotoperíodo de 12 h e irradiância de 52 µmol/m²/s.

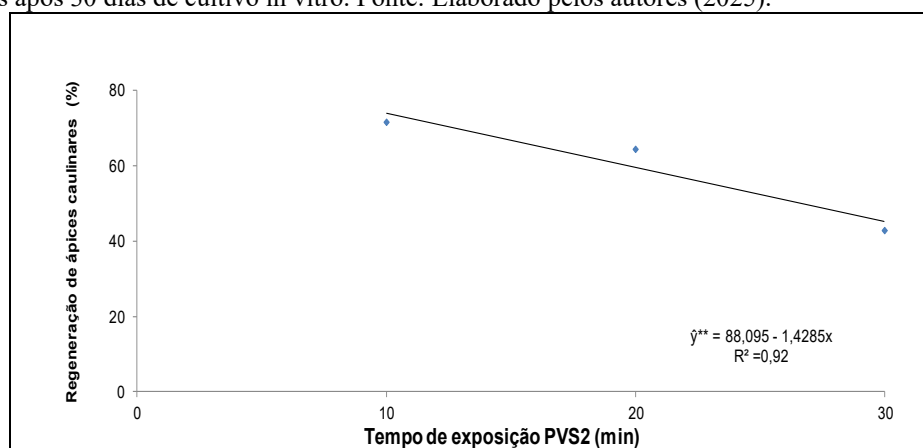
A porcentagem de regeneração foi avaliada aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro, considerando o efeito do tempo de exposição dos ápices caulinares à solução PVS2, com ou sem criopreservação (NL+ ou NL-). Utilizou-se a escala de notas adaptada de Santana *et al.* (2022) onde 0: Esbranquiçado (explante inviável); 1: Amarronzado (explante oxidado); 2: Esverdeado (explante viável). Explantes classificados com notas 0 ou 1 foram considerados inviáveis, enquanto os que atingiram nota 2: viáveis.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (tempos de exposição ao PVS2: 10, 20 e 30 min) e sete repetições. O controle consistiu na porcentagem de regeneração de ápices caulinares imersos em PVS2 em diferentes tempos, porém não submetidos à criopreservação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No grupo controle NL- (ápices caulinares não criopreservados em nitrogênio líquido), não houve diferença significativa na porcentagem de regeneração entre os diferentes tempos de exposição à solução PVS2, apresentando resposta linear negativa (Figura 2). Resultados semelhantes foram relatados por Santana *et al.* (2022), que observaram redução na viabilidade dos ápices caulinares de mangabeira com o aumento do tempo de exposição ao PVS2 (25, 50 e 75 min).

Figura 2. Porcentagem de regeneração de ápices caulinares de mangabeira acesso AB imersos em PVS2 e não criopreservados após 30 dias de cultivo in vitro. Fonte: Elaborado pelos autores (2025).



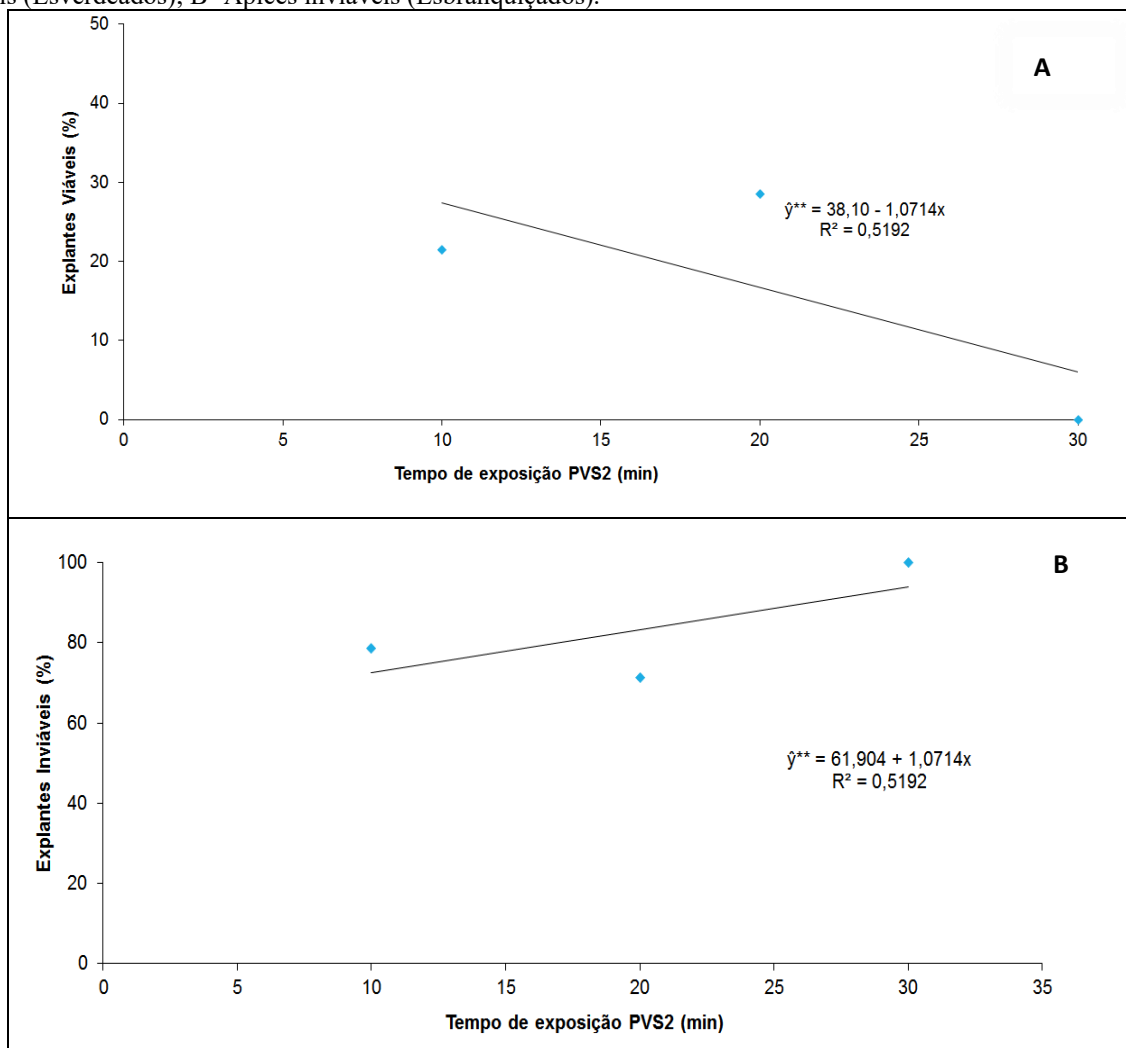
Os crioprotetores exercem papel fundamental na preservação celular, embora possam causar efeitos tóxicos, principalmente devido às elevadas concentrações exigidas (Tanaka *et al.*, 2018). São essenciais em protocolos de vitrificação, porém o sucesso depende da concentração utilizada, bem como da taxa de resfriamento e descongelamento (Tanaka *et al.*, 2018).

No caso dos explantes expostos ao PVS2 e criopreservados (NL+), não foi observado efeito significativo na regeneração após 30 dias de cultivo in vitro (Figura 3). Contudo, verificou-se redução na viabilidade dos explantes com o aumento do tempo de exposição: aos 20 min, cerca de 30% dos explantes permaneceram viáveis, enquanto, aos 30 min, não houve regeneração (Figura 3A). Santana *et al.* (2022) também relataram efeito negativo do PVS2 na viabilidade dos ápices caulinares de mangabeira. Por outro lado, Santos *et al.* (2015) descreveram protocolos bem-sucedidos de vitrificação e vitrificação em gotas, obtendo taxas superiores a 70% de regeneração, especialmente quando segmentos caulinares foram pré-cultivados antes da excisão dos ápices para criopreservação.

Este padrão também foi evidenciado no aumento da inviabilidade dos explantes (Figura 3B), onde a exposição por 30 min ao PVS2 resultou em 100% de inviabilidade. Estudos recentes indicam que o estresse osmótico, provocado pela redução de temperatura e pela drástica diminuição do teor hídrico celular, constitui o principal fator de morte celular durante a criopreservação. Para mitigar

tais efeitos, o uso de agentes crioprotetores como DMSO, glicerol, etilenoglicol e propilenoglicol tornou-se indispensável (Whaley *et al.*, 2021). Além disso, as taxas de resfriamento e reaquecimento são determinantes para a sobrevivência celular, sendo recomendada a presença de crioprotetores, geralmente na concentração de 10% de DMSO, bem como armazenamento em nitrogênio líquido ou sua fase vapor (Whaley *et al.*, 2021).

Figura 3. Ápices de mangabeira acesso AB criopreservados (%) em função do tempo de exposição ao PVS2 A- Ápices viáveis (Esverdeados); B- Ápices inviáveis (Esbranquiçados).



Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

A inviabilidade dos explantes pode estar relacionada também aos danos celulares durante o reaquecimento, etapa crítica para evitar a formação de cristais de gelo e lesões estruturais (Vaz *et al.*, 2020; Roque-Borda *et al.*, 2021). O reaquecimento inadequado compromete a integridade das células, levando à morte celular.

Os crioprotetores mais utilizados são de origem sintética e, embora fundamentais para a viabilidade celular, podem apresentar toxicidade, promovendo alterações na membrana plasmática e nas proteínas mitocondriais. Para reduzir tais efeitos, combinações de diferentes crioprotetores ou

a adição de antioxidantes têm sido propostas, visando proteger os tecidos vegetais durante a criopreservação (Marcantonini *et al.*, 2022).

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, todos os explantes apresentaram sinais de oxidação, com formação de compostos oxidativos ou danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Tal fenômeno está associado à alta concentração de lipídios presente nos tecidos da mangabeira. O estresse oxidativo é um dos principais desafios na criopreservação, influenciando a estabilidade celular e o equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), Ochatt *et al.* (2021). Monitorar a atividade de enzimas antioxidantes pode fornecer subsídios valiosos para aprimorar protocolos de criopreservação, contribuindo para a viabilidade do material vegetal conservado. Assim, a incorporação de antioxidantes nos meios de regeneração pode representar uma estratégia promissora para reduzir os danos oxidativos durante e após o processo de criopreservação contribuam significativamente para o avanço do conhecimento sobre o tema abordado.

4 CONCLUSÃO

Não houve efeito positivo da redução do tempo de exposição ao PVS2 na oxidação e regeneração de ápices caulinares criopreservados do acesso Água Boa de mangabeira. Até o momento não há protocolos de criopreservação de mangaba com plena repetibilidade, evidenciando a necessidade de pesquisas adicionais e ajustes metodológicos para o estabelecimento de estratégia complementar para a conservação da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte técnico e infraestrutura disponibilizados para a realização deste trabalho, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (Programa 001) e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) da Universidade Federal de Sergipe.

REFERÊNCIAS

- 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.
- CASTRO, H. C.; CHAGAS, E. F. das; LIBERAL, M. H. T.; CARDOSO, C. V.; BARBOSA, E. V.; MAGALHÃES, H. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. n. 1, p. 143-156, 2020.
- ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.; CHIN, H.; REED, B. editors. **Conservation of tropical plant species**. New York: Springer, 2013.
- FALTUS, M.; BILAVCIK, A.; ZAMECNIK, J. Vitrification ability of combined and single cryoprotective agents. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2392, 2021.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G. J.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-70, 2006.
- HAMMOND, S. D. H.; FALTUS, M.; ZAMECNIK, J. Droplet-vitrification methods for apical bud cryopreservation of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Rob.]. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 147, n. 2, p. 197-208, 2021.
- LÉDO, A. S. **Germinação in vitro da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2007. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).
- MARCANTONINI, G.; BIGNAMI, M.; COSSIGNANI, L.; MOLINARI, R.; ALFEI, S. Natural cryoprotective and cytoprotective agents in cryopreservation: a focus on melatonin. **Molecules**, v. 27, p. 10, p. 3254, 2022.
- NASCIMENTO, C. M.; LÉDO, A. S.; SOUZA, E. H.; OLIVEIRA, M. S. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2020.
- NUNES, V. V.; ALVES, R. E.; FERREIRA, M. L. G.; BESSA, L. A.; VIANA, E. M.; OLIVEIRA, A. A. Pharmaceutical, food potential and molecular data of *Hancornia speciosa* Gomes: a systematic review. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 69, n. 2, p. 525-43, 2022.
- OCHATT, S.; LAMBARDI, M.; PANIS, B.; PATHIRANA, R.; REVILLA, M. A.; WANG, Q. C. Cryopreservation and in vitro banking: A cool subject – Preface from the editors. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 1-5, 2021.
- OLIVEIRA, A. C. A.; SOUZA K. C. P.; PAULA, L. C.; SANTOS, I. R.; SANTOS, P. A. A. Cryopreservation of sugarcane species by droplet-vitrification. **Revista Foco**, v. 16, n. 8, e2792, 2023.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Situação das tecnologias de criopreservação em plantas (culturas e árvores florestais). In: PANIS, B.; LAMBARDI, M. editor. **O papel da biotecnologia**. Torino: Villa Gualino; 2005.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Vitrification of apical meristem droplets: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulture**, v. 560, p. 79-86, 2001.

PAULA, L. C.; SILVA, M. J. M.; OLIVEIRA, J. B.; SOUZA, K. C. P.; SANTOS, A. P. Influence of preservation methods on the bioactivity of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian savannah. *Food Sci Technol*. 2019 Apr;39(2):403–9.

ROQUE-BORDA, C. A.; FALTUS, M.; ENGELMANN, F. 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, n. 1, p. 30-3, 1990.

SANTANA, F. V.; SANTOS, I. R.; LÉDO, A. S.; OLIVEIRA, M. do S.; SANTOS, P. A. A. Effects of droplet vitrification on the regeneration of apical shoot tips of mangabeira accessions. **Research Society Development**, v. 11, n. 17, p. e38111738734, 2022.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Guia prático de criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa; 2023. (Documento 385).

SANTOS, P. A. A.; SANTOS, I. R.; OLIVEIRA, E. J. D.; LÉDO, A. S. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 289-96, 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. 31-9, 2012.

SILVA JUNIOR, J. F. *et al.* *Hancornia speciosa* mangaba, In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; GERMAIN, F.; PAREVN, C. E. editores. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília (DF): MMA; 2018.

SILVA JUNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 1-196, 2004.

TANAKA, D.; NIINO, T.; UEMURA, M. Cryopreservation of plant genetic resources. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1081, p. 355-69, 2018.

VAZ, C. F.; SOUZA, E. H.; SANTOS NETO, A. M.; OLIVEIRA, M. S. Cellular alterations in kaolinitic apexes and genetic stability of Eucalyptus plants submitted to cryopreservation. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94232-55, 2020.

WHALEY D, LEE SC, STOWE T, BETZ G. Cryopreservation: An overview of principles and specific cell considerations. **Cell Transplantation**, v. 30, 2021.

WU, Y.J.; ZHANG, L. H.; ZHAO, H. L.; ZHAO, J.; WANG Q. Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. var Zihua). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 161-8, 2007.