

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 24

ISSN 1678-1961
Agosto, 2007

Germinação *In Vitro* da Mangabeira





ISSN 1678-1961

Setembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 24

Germinação In Vitro da Mangabeira

Ana da Silva Léo
Josué Francisco da Silva Junior
Sarah Brandão Santa Cruz Barboza

Aracaju, SE
2007

Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br>

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Beira Mar, 3250

Aracaju, SE

CEP: 49025-040

Fone: **79-4009-1300

Fax: **79-4009-1369

www.cpatc.embrapa.br

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Edson Diogo Tavares

Secretária-Executiva: Maria Ester Gonçalves Moura

Membros: Emanuel Richard Carvalho Donald, Emanuel Richard Carvalho Donald,

José Henrique de Albuquerque Rangel, Julio Roberto Araujo de Amorim,

Ronaldo Souza Resende, Joana Maria Santos Ferreira

Normalização bibliográfica: Josete Cunha Melo

Supervisora Editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Tratamento de ilustrações: Diego Corrêa Alcântara Melo

Foto(s) da capa: Arquivo Embrapa Tabuleiros Costeiros

Editoração eletrônica: Diego Corrêa Alcântara Melo

1ª edição

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Tabuleiros Costeiros

Lédo, Ana da Silva

Germinação *in vitro* da mangabeira / Ana Silva Lédo ... [et al] -- Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007.

16 p. : il.- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961; 24).

Disponível em:

1. Mangaba. 2. Genética. I. Lédo, Ana da Silva. II. Silva Junior, Josué Francisco da. III. Barboza, Sarah Brandão Santa Cruz. IV. Título. V. Série.

CDD-634.6

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	10
Conclusões	13
Agradecimentos	14
Referências Bibliográficas	14

Germinação *In Vitro* da Mangabeira

A. da S. Lédo ¹ J. F. da S. Junior ² S. B. S. C. Barboza ³

Resumo

O objetivo do trabalho foi determinar as condições mais favoráveis para a germinação *in vitro* de sementes e o crescimento inicial de plântulas de mangabeira. Após assepsia, sementes oriundas de frutos maduros foram inoculadas em tubos de ensaio contendo os seguintes tratamentos: T1-15 mL de meio de cultura MS; T2-15 mL de meio de cultura MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado; T3-15 mL de meio de cultura ½ MS; e T4-15 mL de meio de cultura ½ MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Todos os meios de cultura foram gelificados com 0,3 g L⁻¹ de Phytigel® e suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições, sendo cada parcela experimental composta de dez tubos de ensaio contendo uma semente cada. Não houve diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de germinação aos 20 dias, que variou de 95 a 100%. Quanto ao comprimento da raiz principal, observou-se que o meio

¹ Pesquisadora Embrapa Tabuleiros Costeiros Avenida Beira Mar, 3250, Praia Treze de Julho Caixa postal. 44 CEP 49025-040 Aracaju, SE analedo@cpatc.embrapa.br

² Pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros josue@cpatc.embrapa.br

³ Pesquisadora Embrapa Tabuleiros Costeiros/Deagro Avenida Beira Mar, 3250, Praia Treze de Julho Caixa postal. 44 CEP49025-040 Aracaju, SE sarah@cpatc.embrapa.br

de cultura constituído de $\frac{1}{2}$ MS com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado proporcionou maior crescimento quando comparado com os demais tratamentos. Aos 50 dias, não foi observada a formação de plântulas anormais e nem diferenças significativas do comprimento da parte aérea das plântulas. Entretanto, a diluição em 50% dos sais do meio MS associada à presença de carvão ativado induziu maior crescimento da raiz principal (8,50 cm) quando comparado com meio MS, na presença (6,19 cm) ou ausência (6,00 cm) de carvão ativado.

Termos para indexação: Propagação *in vitro*, meio de cultura, sementes, Apocynaceae.

In Vitro Germination of Mangaba

Abstract

The objective of this study was to determine the most favorable conditions for the *in vitro* germination of mangaba seeds and initial development of plantlets. After asepsis, emerging seeds of mature fruits were inoculated in tubes containing the next treatments: T1-15 mL of MS culture medium; T2-15 mL of MS culture medium + 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal; T3-15 mL of ½ MS culture medium; and T4-15 mL of ½ MS culture medium + 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal. All the culture medium were gellified with 0.3 g L⁻¹ of Phytagel® and supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose. The statistical design was completely randomized with four treatments, eight repetitions and ten seeds by experimental unit. There was not significant difference of the treatments for the germination percentage at twenty days, which varied from 95 to 100%. The ½ MS with 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal promoted higher growth the main root when compared with the others treatments. After 50 days, abnormal plantlets were not observed and neither significant difference were verified among the length of the aerial part. However, the dilution in 50% of the MS culture medium associated to the presence of activated charcoal induced higher growth of the main root (8.50 cm) when compared with MS culture medium in the presence (6.19 cm) or absence (6.00 cm) of activated charcoal.

Index terms: *In vitro* propagation, seeds, culture medium, Apocynaceae.

Introdução

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), nativa dos tabuleiros costeiros, baixada litorânea e cerrados do Brasil, constitui-se em uma das mais importantes matérias primas para a indústria de sucos e sorvetes do Nordeste e está entre as dez espécies selecionadas como de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/World Bank/GEF/MMA/Probio, com maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste (Ferreira et al., 2005).

A cultura ainda está em fase de domesticação e, portanto, todos os aspectos relacionados ao seu cultivo ainda necessitam ser melhor estudados, podendo-se citar: propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais, estudos sobre a fenologia da planta e aspectos relacionados com a pré e pós-colheita do fruto. Tecnologias de propagação in vitro bem desenvolvidas e/ou adaptadas para a mangabeira são de grande importância para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento genético da mangabeira.

O cultivo in vitro é um procedimento significativo na propagação de diferentes espécies. No entanto, alguns problemas têm sido identificados na micropropagação da mangabeira e, dentre eles, destacam-se os contaminantes fúngicos e bacterianos presentes em explantes oriundos de plantas adultas que dificultam o estabelecimento de protocolos de micropropagação (Alloufa, 2003; Lemos et al., 2006).

O estabelecimento de protocolos de micropropagação de espécies lenhosas a partir de explantes oriundos de plantas germinadas in vitro é mais viável sob o ponto de vista fisiológico e experimental, devido ao estágio juvenil e capacidade de maior resposta in vitro, possibilitando a condução de inúmeros experimentos (Gratapaglia & Machado, 1998). Além disso, a obtenção de explantes assépticos resolve problemas como a dificuldade de desinfestar material vegetal e a baixa resposta morfogênica dos tecidos arbóreos adultos (Grigoletto, 1997).

Outro aspecto a ser considerado é que a germinação de sementes in vitro permite, freqüentemente, uma maior germinabilidade das sementes do que em viveiros, provavelmente porque as condições in vitro são mais adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plântula (Noletto & Silveira, 2004).

Diversos trabalhos com a germinação *in vitro* de mangabeira, variedades botânicas do Nordeste e dos Cerrados, foram realizados (Grigolleteo, 1997; Lemos et al., 2006; Machado et al., 2004). Entretanto, aspectos sobre o crescimento inicial *in vitro* da parte aérea e sistema radicular necessitam ser melhor caracterizados.

O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento inicial de plântulas de mangabeira em diferentes meios de germinação *in vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE e as sementes foram obtidas de frutos “de vez” de plantas matrizes de população nativa de mangabeira da Estação Experimental de Itaporanga da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

As sementes tiveram seus tegumentos removidos para facilitar a germinação e foram desinfestadas com a seguinte seqüência de tratamentos: a) lavagem com solução detergente; b) enxágüe em água destilada para remoção do detergente; c) imersão em fungicida benomil 5,0 g L⁻¹ por 5 minutos em câmara de fluxo laminar; d) três lavagens com água destilada estéril; e) imersão em álcool etílico 70% por 10 segundos; f) imersão em solução de hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos e g) três enxágües finais com água destilada estéril (Lemos, 2003).

As sementes desinfestadas foram inoculadas, em tubos de ensaio contendo os seguintes tratamentos: T1-15 mL de meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962); T2-15 mL de meio básico MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado; T3-15 mL de meio básico ½ MS; T4-15 mL de meio básico ½ MS + 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. O meio de cultura, em todos os tratamentos, foi gelificado com 0,3 g L⁻¹ de Phytigel® e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 e todos os tratamentos submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 25 ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 µmol m⁻²s⁻¹ de irradiância).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições, sendo cada parcela experimental composta de dez tubos de ensaio contendo uma semente cada. Aos 20 dias da inoculação,

foram avaliadas a porcentagem de contaminação, de germinação e comprimento da raiz principal e aos 50 dias a porcentagem de plântulas anormais, o comprimento da parte aérea e da raiz principal. Como plântulas anormais, foram consideradas aquelas que apresentavam ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea e/ou do sistema radicular. As médias das variáveis foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

O processo de assepsia das sementes foi eficiente, não sendo observada nenhuma contaminação fúngica ou bacteriana ao longo do período de condução do ensaio.

Na terceira semana, após a inoculação, observou-se a emissão e o rápido crescimento da radícula (Figuras 1A e 1B), com o posterior desenvolvimento de raízes secundárias (Figura 1C). A partir da quarta semana ocorreu a emergência do epicótilo de coloração roxo-avermelhada, dos nós cotiledonares e do primeiro par de folhas (Figura 1D). A rápida elongação do epicótilo e a expansão do limbo foliar do primeiro par de folhas, foram verificados entre a quarta e a sexta semana após a inoculação (Figura 1E).

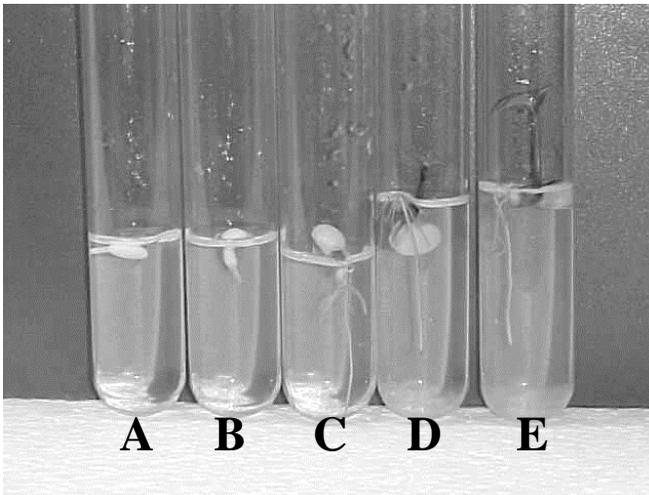


Figura 1. Fases da germinação *in vitro* de mangabeira. A e B- emissão da radícula; C- crescimento da raiz principal e secundárias; D- lançamento do primeiro par de folhas; e E-elongação do epicótilo e expansão do limbo foliar.

Conforme Tabela 1, não foi constatada diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de germinação aos vinte dias, que variou de 95 a 100%. Em estudos de germinação de mangabeira sob diferentes condições de cultura in vitro, Pinheiro et al. (2001) obtiveram, aproximadamente, 75% de germinação em meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 . Lemos (2003) alcançou 62% em meio MS sem reguladores de crescimento e Sousa et al. (2005), 70% de germinação em meio básico MS sólido ou líquido, independente de apresentarem ou não o tegumento. Machado et al. (2004) avaliando o potencial de propagação in vitro de 11 matrizes de mangabeira nativas do Cerrado, observaram 92,4% de germinação em meio MS sem reguladores de crescimento, não se verificando diferenças entre as matrizes.

Tabela 1. Médias da porcentagem de germinação (% GERM) e comprimento do sistema radicular (CRP) de plântulas de mangabeira sob diferentes condições de cultivo in vitro, aos 20 dias da inoculação.

<i>Tratamentos</i>	<i>% GERM</i>	<i>CRP (cm)</i>
MS	95,00a	1,42b
MS + $2,0 \text{ g L}^{-1}$ carvão ativado	100,00a	1,65b
$\frac{1}{2}$ MS	95,00a	1,69b
$\frac{1}{2}$ MS + $2,0 \text{ g L}^{-1}$ carvão ativado	100,00a	2,72a
CV (%)	6,71	30,24

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A porcentagem de germinação de sementes de mangaba em condições de viveiro, em geral, é baixa não só devido à presença de inibidores na polpa como também ao fato de as sementes serem recalcitrantes (Lorenzi, 2000). Neste estudo, taxas de germinação acima de 95% foram obtidas, provavelmente isto se deve à remoção da polpa do fruto e à rápida inoculação das sementes, evitando a desidratação e mantendo a viabilidade da semente.

Quanto ao comprimento da raiz principal, aos 20 dias observou-se que o meio de cultura constituído de $\frac{1}{2}$ MS com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado proporcionou maior crescimento quando comparado com os demais tratamentos (Figura 2). Os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos meios de cultivo in vitro influenciam vários processos metabólicos apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (Maldaner et al., 2006). Provavelmente a redução da concentração de sais em 50% apresentou efeito positivo no crescimento de

tecidos radiculares. Russowski & Nicoloso (2003), avaliando o efeito da variação de N e P do meio MS no crescimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen), observaram que o número de raízes e o percentual de enraizamento foi maior na concentração de N equivalente a 50% daquela do meio MS. Com espécies lenhosas, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (Grattapaglia & Machado, 1998).

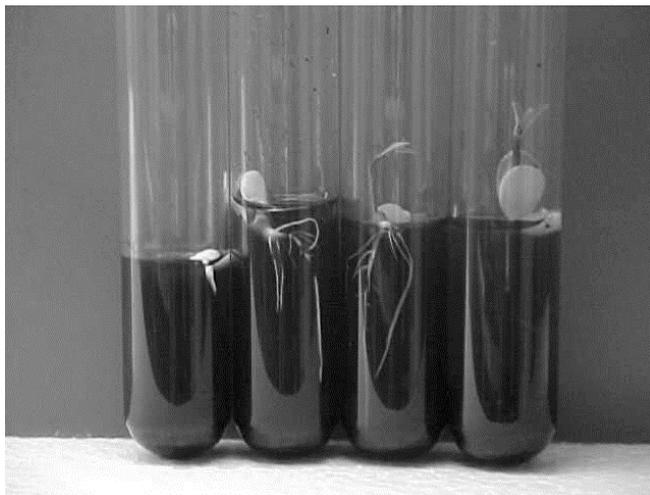


Figura 2. Desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de mangaba em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS com 2 g L^{-1} de carvão ativado.

O carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% pode ser benéfico em alguns casos. Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor pela redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas, principalmente fenóis e/ou quinonas que podem afetar o desenvolvimento do explante (Grattapaglia & Machado, 1998).

Não foi observada a formação de plântulas anormais e nem diferenças significativas do comprimento da parte aérea das plântulas em todos os tratamentos aos 50 dias de inoculação (Tabela 2). A diluição em 50% dos sais do meio de cultura MS associada à presença de carvão ativado induziu maior crescimento longitudinal da raiz principal (8,50 cm) quando comparado com meio MS, na presença (6,19 cm) ou ausência (6,00 cm) de carvão ativado.

Embora, estatisticamente, não tenha sido detectada diferença significativa entre os valores de comprimento da parte aérea, a adição de carvão ativado em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS e MS, aumentou em 55 e 27% o comprimento da parte aérea, respectivamente. Este fato se deve a resposta do efeito benéfico do carvão ativado no sistema radicular, proporcionando um maior alongamento da parte aérea.

Tabela 2. Médias da porcentagem de plântulas normais (% PN), do comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CRP) e da relação CRP/CPA de plântulas de mangabeira sob diferentes condições de cultivo in vitro, aos 50 dias da inoculação.

Tratamentos	% PN	CPA (cm)	CRP (cm)	Relação CRP/CPA
MS	100	6,25a	6,00c	0,96
MS + 2,0 g L ⁻¹ carvão ativado	100	7,94a	6,19c	0,78
$\frac{1}{2}$ MS	100	6,03a	7,03ab	1,17
$\frac{1}{2}$ MS + 2,0 g L ⁻¹ carvão ativado	100	9,38a	8,50a	0,91
CV (%)	-	34,14	23,55	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Observou-se um desenvolvimento balanceado da parte aérea e do sistema radicular das plântulas de mangabeira em todos os tratamentos. Segundo Peres e Kerbauy (2000) o equilíbrio no desenvolvimento entre caule e raízes é vantajoso considerando que ambos possuem funções complementares na sobrevivência geral das plantas.

Os resultados obtidos demonstraram a eficiência da desinfestação das sementes e da germinação e crescimento inicial in vitro na obtenção de plântulas normais e vigorosas de mangabeira. Os resultados poderão ser aplicados na obtenção de explantes juvenis e assépticos para a micropropagação, na propagação sexuada in vitro e na produção de porta-enxertos em futuros trabalhos de microenxertia.

Conclusões

- Todos os meios de cultura testados são eficientes para a germinação in vitro de sementes e formação de plântulas normais de mangabeira.
- O meio de cultura MS com metade da concentração salina, acrescido de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado proporciona 100% de germinação e bom desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plântulas de mangabeira in vitro.

Agradecimentos

A Embrapa pelo aporte de recursos financeiros e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica- CNPq pela concessão de bolsa PIBIC.

Referências Bibliográficas

ALOUFA, M. A. I. Multiplicação e conservação *in vitro* de mangabeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA. 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM. Seção Palestras

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, Parte II, p. 87-132, 1998.

FERREIRA, E. G.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. X.; LOURENÇO, I. P.; LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BARROS, L. M.; RUFINO, M. S. M.; OLIVEIRA, M. E. B. Frutíferas. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M. de; SANTOS JUNIOR, A. G. (Org.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005, p. 49-100.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (Mangabeira)**. Brasília, 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260.

LEMOS, E. E. P. de. Estratégias para a multiplicação clonal da mangabeira em Alagoas. In: Simpósio Brasileiro sobre a Cultura da Mangaba, 1, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: EMBRAPA-CPATC/MAPA, 2003. 1 CD-ROOM.

LEMOS, E. E. P. de; COSTA, M. A. P. de C.; ALOUFA, M. A. I.; LEDO, A. da S. et al. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LEDO, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.125-133, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 1, 3ª ed. Nova Odessa. Editora Plantarum, 2000. 352p.

MACHADO, L. de L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 431-435, maio 2004.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p.1201-1206, jul./ago. 2006.

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

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de Copaiba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120, jul./dez. 2004.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento de raízes. **Revista Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 181-196, mar. 2000.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALOUFA, M. A. I. Germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.57-63, 2003.

SOUSA, C. da S.; SILVA, S. A.; COSTA, M. A. P. C. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Revista Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 29-31, set. 2005.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 297-330

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

