



Protocolo para conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)

Ana da Silva Lédo ¹

Aline de Jesus Sá ²

Micaele da Costa Santos ³

Josué Francisco da Silva Junior ⁴

Ana Veruska Cruz da Silva Muniz ⁵

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie nativa encontrada em várias regiões do país e apresenta o maior potencial de uso imediato entre as fruteiras nativas da região Nordeste (FERREIRA et al., 2005). Nessa região está ocorrendo erosão genética em muitas populações nativas da espécie, em consequência, principalmente da ocupação imobiliária de áreas remanescentes de mangabeira (SILVA JUNIOR et al. (2006). Dessa forma, ressalta-se a necessidade de métodos de conservação eficientes que possam minimizar os riscos de extinção dessa espécie.

A conservação de germoplasma de mangabeira em campo já é realizada por órgãos de pesquisa em alguns estados nordestinos. A Embrapa Tabuleiros Costeiros possui um Banco Ativo de Germoplasma com acessos coletados nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste. Entretanto, a vulnerabilidade que os acessos apresentam nesse tipo de conservação é alta, principalmente devido a incidência de pragas e doenças, intempéries, alto custo de manutenção dentre outros fatores, o que ressalta a necessidade do desenvolvimento de técnicas complementares de conservação. Como a formação de bancos de sementes dessecadas de mangabeira mantidas em condições de baixa temperatura é inviável devido à recalcitrância das

sementes, a conservação *in vitro* pode ser considerada potencial.

A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método complementar à conservação de germoplasma em campo, especialmente para espécies propagadas vegetativamente e para espécies que não podem ter suas sementes conservadas a baixa temperatura e umidade, como as da mangabeira.

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratórios, a partir da técnica de cultura de tecidos, permitindo a rápida multiplicação e armazenamento de germoplasma de plantas em ambiente asséptico, livre de patógenos. Nas condições de crescimento lento, a conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Assim, o objetivo desta publicação é descrever um protocolo adequado para conservação *in vitro* por crescimento lento de segmentos nodais e microestacas de mangabeira, a partir de estudos realizados pelo

¹ Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, analedo@cpatc.embrapa.br.

² Bióloga, Mestre em Agroecossistemas, professora do Governo de Estado de Sergipe, Aracaju, SE.

³ Engenheira Agrônoma, Mestre em Biotecnologia, doutoranda da UFEB, Feira de Santana, BA.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, josue@cpatc.embrapa.br.

⁵ Engenheira Agrônoma, Doutorado em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, anaveruska@cpatc.embrapa.br.

Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Obtenção do material vegetal a ser conservado

a) As sementes que originarão as plântulas assépticas doadoras de explantes deverão ser extraídas de frutos saudáveis e maduros (Figura 1), que caem naturalmente de plantas matrizes livres de pragas e doenças.



Figura 1. Frutos maduros e macerados de mangabeira.

Frutos colhidos próximos à maturação, também chamados “de vez”, podem ser utilizados, mas a retirada das sementes deve ser feita após a maturação completa.

Os frutos devem ser colocados em uma peneira debaixo de água corrente e macerados até a retirada de toda a polpa e de resíduos de látex (Figura 2).



Figura 2. Extração da polpa e do látex das sementes.

Em seguida, as sementes são mantidas sobre papel absorvente ou jornal à sombra por 24 horas. Após esse período, devem ser descartadas as imaturas, mal formadas ou doentes.

Preparo de meio de cultura de germinação, desinfestação e inoculação de sementes para obtenção de plântulas de mangabeira assépticas

a) O meio de cultura MS, Tabela 1, (MURASHIGE; SKOOG, 1962) deverá ser preparado com 3% de

sacarose e gelificado com 0,6% de ágar ou 0,3% de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 (LÉDO et al., 2007).

Tabela 1. Componentes do meio de cultura básico de Murashige & Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

| Componentes | Concentração | |
|---|--------------------|--------|
| | mg L ⁻¹ | mM |
| Macronutrientes | | |
| NH ₄ NO ₃ | 1.650 | 20,6 |
| KNO ₃ | 1.900 | 18,8 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 | 3,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 | 1,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | 1,25 |
| Micronutrientes | | |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 | 0,100 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 | 0,030 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | 0,100 |
| KI | 0,83 | 0,0005 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 | 0,0001 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | 0,0001 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 | 0,0001 |
| FeEDTA | | |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37,3 | 0,10 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 | 0,10 |
| Vitaminas | | |
| Tiamina - HCl | 0,1 | 0,0003 |
| Piridoxina - HCl | 0,5 | 0,0024 |
| Ácido nicotínico | 0,5 | 0,0040 |
| Glicina | 2,0 | 0,0270 |
| Mio-Inositol | 100 | 0,05 |
| Sacarose | 30.000 | 87,6 |

Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL, do tipo “maionese” (30 mL/frasco) ou em tubos de ensaio 20 x 150 mm (25 mL/tubo), vedados com tampas plásticas ou de papel alumínio, e autoclavados por 18 minutos a 1,1Kgf cm⁻², em temperatura de 121 °C.

b) Em câmara de fluxo laminar, as sementes deverão ser previamente tratadas com solução de antibiótico rifampicina 300 mg L⁻¹ por 10 minutos, em seguida, desinfestadas com a imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto, imersão em hipoclorito de sódio a 1-1,25% por 20 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril.

c) As sementes devem ser inoculadas com auxílio de pinça individualmente nos tubos de ensaio, ou em número de três nos frascos de vidro, na posição horizontal (Figura 3).



Figura 3. Etapas da germinação *in vitro* da mangabeira.

d) As culturas devem ser mantidas até a germinação completa (Figura 3), por um período de 60 dias, em sala de crescimento com temperatura controlada de 27 ± 2 °C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas ($52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância).

Preparo de meio de cultura de conservação, excisão e transferência de segmentos nodais de mangabeira

a) O meio de conservação por crescimento lento para segmentos nodais deverá ser preparado com a concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 1 mg L^{-1} de ácido indol acético (AIA) e 1 mg L^{-1} de benzilaminopurina (BAP), sem sacarose, na presença de 10 ou 20 g L^{-1} de sorbitol e gelificado com 0,6% de ágar ou 0,3% de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 (SÁ et al., 2011).

b) Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em tubos de ensaio de 35 x 127 mm (25 mL/tubo), vedados com tampas plásticas e autoclavados por 18 minutos a $1,1 \text{ Kg f cm}^{-2}$, em temperatura de 121 °C.

c) os segmentos nodais com 2 cm de comprimento deverão ser excisados de plântulas assépticas de mangabeira de 60 dias de idade, com auxílio de pinça e bisturi e inoculados diretamente nos tubos de ensaio na posição vertical (um/tubo de ensaio) (Figura 4).



Figura 4. Segmento nodal em meio de conservação.

d) As culturas devem ser mantidas por até 180 dias em sala de crescimento com temperatura controlada de 27 ± 2 °C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas ($52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância).

Preparo de meio de cultura de conservação, excisão e transferência de microestacas de mangabeira

a) O meio de conservação por crescimento lento para microestacas deverá ser preparado com a concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 1 mg L^{-1} de ácido indol acético (AIA), 1 mg L^{-1} de benzilaminopurina (BAP), 3% sacarose, na presença de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido abscísico (ABA) e gelificado com 0,6% de ágar ou 0,3% de Phytage® e pH ajustado para 5,8 (SÁ et al., 2011).

b) Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL, do tipo “maionese” (30 mL/frasco) e autoclavados por 18 minutos a $1,1 \text{ Kg f cm}^{-2}$, em temperatura de 121 °C.

c) as microestacas com aproximadamente 7 cm de comprimento deverão ser excisadas de plântulas assépticas de mangabeira de 60 dias de idade com auxílio de pinça e bisturi e inoculadas diretamente nos frascos na posição vertical (Figura 5).



Figura 5. Microestacas de mangabeira inoculadas em meio de conservação na presença de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ABA.

d) As culturas devem ser mantidas por até 180 dias em sala de crescimento com temperatura controlada de 27 ± 2 °C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas ($52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância).

Preparo de meio de cultura de retomada do crescimento e transferência de segmentos nodais e microestacas de mangabeira

a) O meio de retomada do crescimento para segmentos nodais e microestacas deverá ser preparado com a concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

suplementado com 1 mg L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) e 1 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), com 3% sacarose, gelificado com 0,6% de ágar ou 0,3% de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 (SANTOS et al., 2010; SÁ et al., 2011).

b) Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em frascos com capacidade máxima de 250 mL tipo “maionese” (30 mL/frasco) com tampa plástica e autoclavados por 18 minutos a 1,1Kgf cm⁻², em temperatura de 121 °C.

c) os segmentos nodais e microestacas submetidos a condições de crescimento lento deverão ser transferidos na posição vertical para o meio de crescimento, com auxílio de pinça (Figura 6).



Figura 6. Segmento nodal em fase de retomada do crescimento.

d) As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, dispendo de luminosidade (38 μmol m² s⁻¹) fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, e fotoperíodo de 16 horas de luz e após 60 dias poderão ser repicadas para novo meio de cultura para fins de micropropagação.

Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, à Fundação de Apoio à Pesquisa, à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe-FAPITEC/SE e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Processos n. 562728/2008-2, 474191/2007-9, 563363/2010-0), pelo aporte de recursos financeiros e concessão de bolsa.

Referências

FERREIRA, E.G. et al. Frutíferas. In: SAMPAIO, E. V. S. B. et al. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005, p. 49-100.

LÉDO, A. S.; VIEIRA, G. S. S; BARBOZA, S. B. S. C. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 989-993, 2007.

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

SÁ, A. J. ; LEDO, A. da S.; LEDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTOS, M. da C.; LÉDO, A. da S.; LEDO, C. A. da S. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, p. 735-741, 2011.

SILVA JÚNIOR, J. F. et al. Recursos genéticos nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea do Nordeste. In: SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. (Ed.). **A cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 57-74.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998. c. 11, p. 297-330.

Comunicado Técnico, 115

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/cot_115.pdf

1ª edição (2011)

Comitê de publicações

Presidente: Ronaldo Souza Resende.

Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Membros: Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Ivênio Rubens de Oliveira, Joézio Luiz dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Luciana Marques de Carvalho, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane Talamini.

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Tratamento das ilustrações: Nathalie de Góis Paula

Editoreção eletrônica: Nathalie de Góis Paula