

# Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes)

K. C. S. Freire<sup>1</sup>; G. G. Coelho<sup>1</sup>; S. L. Russo<sup>1</sup>; A. V. C. da Silva<sup>2</sup>; A.S. Léo<sup>2</sup>;  
A.J.Sá<sup>1</sup>; C.A. Machado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, 49025-040, Aracaju-Se, Brasil

kktinna@hotmail.com

(Recebido em 26 de julho de 2010; aceito em 12 de novembro de 2011)

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de ANA e BAP na conversão *in vitro* de embriões zigóticos de mangabeira, e o desenvolvimento de métodos e técnicas eficientes de aclimação de plântulas de mangaba oriundas da cultura *in vitro* de embriões. Embriões zigóticos cultivados em meio MS com 0,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 3,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, combinados com diferentes concentrações de ANA (0; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L<sup>-1</sup>) e de BAP (0; 0,5; 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>). Para a conversão de embriões zigóticos de mangabeira é dispensável a presença de ANA ou BAP no meio de cultura. O transplante das plântulas foi realizado em copinhos de 300 cm<sup>3</sup>, contendo os substratos esterilizados: T1- areia lavada; T2- areia + pó da casca de coco seco (1:1) e T3- vermiculita + areia (1:1), relacionadas às avaliações de crescimento das plantas (altura de plântula, número de folhas, número de raízes e vigor) para condições *ex vitro*. Os substratos com areia e pó da casca de coco seco (1:1) e vermiculita e areia (1:1) proporcionaram maior crescimento da parte aérea (2,2 e 2,8 cm), número de folhas (3,0 e 3,8) e número de nós (1,60 e 2,2).

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes; Apocynaceae; cultura de embrião

This study aimed to evaluate the effect of ANA and BAP on *in vitro* conversion of zygotic embryos of *H. speciosa*, and the development of efficient methods and techniques of acclimatization of mangaba derived from *in vitro* culture of embryos. Zygotic embryos cultured on MS medium with 0,3 g L<sup>-1</sup> Phytigel® and 3,0 g L<sup>-1</sup> sucrose, combined with different concentrations of ANA (0, 0,2, 0,4 and 0,6 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (0, 0,5, 1 and 2 mg L<sup>-1</sup>). For the conversion of zygotic embryos of mangabeira is no need for the presence of ANA or BAP in the culture. Transplanting of seedlings was carried out in cups of 300 cm<sup>3</sup>, containing the sterilized substrates: T1- washed sand, T2- sand + dust of coconut coir (1:1) and T3-vermiculite + sand (1:1), related assessments of plant growth (seedling height, leaf number, root number and force) to *ex vitro* conditions. The substrates with sand and dust of coconut coir (1:1) and vermiculite and sand (1:1) resulted in greater shoot growth (2,2 and 2,8 cm), number of leaves (3,0 and 3,8) and number of nodes (1,60 and 2,2).

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes; Apocynaceae; embryo culture

## 1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie frutífera da família Apocynaceae, nativa de paisagens de tabuleiros costeiros com solos de textura arenosa, baixada litorânea e cerrados do Brasil, constitui-se em uma das mais importantes matérias primas para a indústria de sucos e sorvetes do Nordeste. Essa frutífera 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).

Segundo Lemos et al. (2006), plantas elite podem estar se perdendo e a pesquisa científica precisa desenvolver meios para fixar vegetativamente estas, sob o risco de se extinguir um dos mais ricos bancos naturais de germoplasma da espécie. Além disso, a introdução da mangabeira ao cultivo comercial depende, entre outras, da determinação de técnicas adequadas de propagação assexuada. A propagação dessa fruteira no Nordeste tem sido feita principalmente por meio de sementes. Esse tipo de propagação apresenta desvantagens, como longo período de

imaturidade das plantas e a variabilidade genética das progênies em desenvolvimento, quantidade e qualidade dos frutos produzidos, além de outros caracteres agronômicos importantes na produção comercial (Pereira et al., 2006).

A propagação da mangabeira por métodos tradicionais tem sido dificultada devido ao fato das sementes serem recalcitrantes, além de ser uma espécie alógama, resultando em alto grau de variabilidade de muitas características de importância econômica quando propagada por sementes (Campbell, 1996). O cultivo comercial da mangabeira no Nordeste depende, entre outras, da determinação de técnicas adequadas de propagação.

Técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas como estratégias complementares para a conservação de recursos genéticos vegetais e apresentam vantagens (NASS, 2001), como a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livres dos riscos que existem em condições *ex vitro*. Dentre diversos explantes, os embriões zigóticos têm sido utilizados para protocolos de criopreservação.

A cultura de embriões promove: o controle da embriogênese; da produção de haplóides, a quebra de dormência, produção de plântulas assépticas, além de elucidar problemas relacionados à nutrição do embrião no óvulo (COLLINS; GROSSER, 1984; HU; FERREIRA, 1998).

A utilização de métodos de propagação *in vitro* apresenta inúmeras vantagens como, por exemplo, a manutenção de características da planta-mãe e o rápido incremento do número de plantas, promovendo a implantação de plantios uniformes. Apesar dos grandes avanços das técnicas de cultura de tecidos, o estabelecimento de protocolos eficientes que estimulem a organogênese e/ou embriogênese em plantas lenhosas é muito limitado, fato que se deve à recalcitrância da maioria dessas espécies. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* da mangabeira (Pereira Neto, 1991; Aloufa, 2003; Costa et al., 2003; Fonseca et al., 2003; Lemos, 2003; Moreira et al., 2003; Machado et al., 2004, citados por Lemos et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ácido naftaleno acético (ANA) e do benzilaminopurina (BAP) na conversão *in vitro* de embriões zigóticos de mangabeira, e o desenvolvimento de métodos e técnicas eficientes de aclimatação de plântulas de mangaba oriundas da cultura *in vitro* de embriões zigóticos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju-Sergipe.

### 2.1. Germinação *in vitro* de embriões de mangaba

Sementes obtidas de frutos maduros de plantas matrizes de população nativa de mangabeira da Estação Experimental de Itaporanga, SE. As sementes foram desinfestadas (álcool e hipoclorito de sódio) em câmara de fluxo laminar (Figura 1) e, em seguida, tiveram seus embriões zigóticos extraídos e inoculados em tubos de ensaio com meio de cultura MS gelificado com 0,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e suplementado com 3,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram testados os seguintes tratamentos: ANA (0; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L<sup>-1</sup>) combinado com BAP (0; 0,5; 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>).



Figura 1. A - Fruto da mangabeira colhida para a extração da semente; B - Remoção da polpa do fruto; C - Sementes de mangaba lavadas; D - Assepsia das sementes de mangaba em câmara de fluxo laminar (Fonte: Karla Freire, 2008).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 X 4 (4 concentrações de ANA x 4 de BAP) e três repetições, sendo cada parcela experimental composta de quatro tubos de ensaio contendo um embrião cada. O pH foi ajustado para 5,8 e todos os tratamentos submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Após o semeio, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria ( $52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância).

Quarenta e cinco dias após inoculação, foram avaliadas a porcentagem de plântulas normais, o comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes e porcentagem de explantes com formação de calo. Como plântulas normais, foram consideradas aquelas que apresentavam crescimento da parte aérea e do sistema radicular. As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 2.2. Aclimação de plântulas de mangaba oriundas de cultura de embrião

Foram utilizadas plântulas com, aproximadamente, 90 dias de cultivo *in vitro*, que após a retirada dos frascos com meio de cultura, tiveram seu sistema radicular lavado em água corrente. O transplante foi realizado em copinhos de 300 cm<sup>3</sup>, contendo os seguintes substratos esterilizados: T1- areia lavada; T2- areia + pó da casca de coco seco (1:1) e T3- vermiculita + areia (1:1).

As mudas permaneceram em estufa com sistema de irrigação com microaspersão e 60% de sombreamento por 60 dias. A cada sete dias, foi realizada a suplementação com meio de cultura de Murashige & Shoog (1962), com metade da concentração de sais, vitaminas e aminoácidos. No período inicial de sete dias foi utilizado um saco plástico para simular a câmara úmida.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela experimental foi composta de dois recipientes com uma muda.

As avaliações relacionadas ao crescimento das plantas (altura de plântula, número de folhas, número de raízes e vigor) foram realizadas aos 120 dias após a transferência para condições *ex vitro*.

Plântulas de mangaba com aproximadamente 90 dias oriundas da cultura de embriões, serão retiradas dos frascos e terão seu sistema radicular lavado em água corrente.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5 % de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Germinação *in vitro* de embriões de mangaba

Conforme análise de variância não houve efeito significativo da interação ANA e BAP para os caracteres avaliados. Entretanto, houve efeito significativo do ANA para o comprimento da parte aérea, número de folhas e percentagem de plântulas normais e de explantes com calo (Tabela 1). O efeito do BAP foi observado somente para a percentagem de explantes com calo.

*Tabela 1. Médias da percentagem de plântulas normais (% PN), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR) e percentagem de explantes com formação de calo (% EC) aos 45 dias de cultivo de embriões zigóticos de mangabeira em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.*

Tratamentos	PN (%)	CPA (cm)	NF	NR	EC (%)
ANA (mg L <sup>-1</sup> )					
0	91,67a	3,33ab	5,25a	1,67a	0d
0,2	95,83a	4,08a	4,50ab	2,42a	6,25cd
0,4	50,00b	2,17b	2,83b	2,58a	42,08a
0,6	85,00a	3,08ab	4,33ab	2,91a	22,91b
BAP (mg L <sup>-1</sup> )					
0	86,67a	2,83a	3,17b	2,42a	5,63a
0,5	74,17a	2,58a	3,25b	2,25a	17,91ab
1,0	83,33a	3,58a	5,25a	2,92a	15,00ab
2,0	78,33a	3,66a	5,25a	2,00a	32,50a

*Médias seguidas na coluna por letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.*

Obteve-se de 50 a 95,83% de plântulas normais na presença de ANA e de 74,14 a 83,33% na presença de BAP. Estes resultados foram superiores aos obtidos por Costa et al. (2003) que não alcançaram êxito na germinação de embriões zigóticos que se apresentaram necrosados em meio MS na presença de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Na concentração de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA observou-se um maior incremento da parte aérea das plântulas *in vitro*, com aumentos no comprimento e número de folhas. A presença de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP favoreceu a formação de folhas nas plântulas de mangabeira.

A presença de BAP e de ANA em concentrações de 0,4 e 0,6 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, no meio de cultura, induziu processos morfogênicos não-desejáveis como a formação de calos, na germinação *in vitro* dos embriões. Isto porque, embriões excisados no estágio maduro ou próximo a esse são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis (HU & FERREIRA, 1998).



Figura 2. A- Embrião de mangaba com desenvolvimento inicial da parte aérea e da raiz; B- Plântula de mangaba oriunda de cultura de embrião após 45 dias (Fonte: Karla Freire, 2008).

### 3.2 Aclimação de plântulas de mangaba oriundas de cultura de embrião

No estudo de aclimação de plântulas de mangaba oriundas de cultura de embrião, não houve efeito significativo dos tratamentos para os caracteres avaliados. Nos tratamentos T1, T2 e T3 foram observados 1,11; 1,61 e 1,5% de comprimento da parte aérea das plântulas, 1,4; 3,8 e 3% de número de folhas respectivamente (Tabela 2). A porcentagem de contaminação das plântulas foi baixa variando de 6 a 10%, porém a porcentagem de oxidação observou-se relativamente alta nos tratamentos.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, o substrato do tratamento 2, observou-se uma maior porcentagem de comprimento da parte aérea e número de folhas em relação aos outros tratamentos, e uma baixa oxidação das plântulas nos tratamentos T1 e T2. No tratamento 3, observou-se a menor oxidação em relação aos demais tratamentos (63%).

Estudos adicionais sobre o efeito da aclimação em plântulas de mangaba em diferentes combinações de substrato deverão ser conduzidos para indução de um sistema eficiente *ex vitro*, além da determinação do rendimento, avaliação do vigor das culturas e um protocolo eficiente de aclimação de mudas.

Tabela 2. Médias da porcentagem do comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), porcentagem de plântulas contaminadas (CONT) e com oxidação (OXI) aos 30 dias de plântulas de embriões zigóticos de mangabeira em diferentes substratos esterilizados.

Tratamentos	CPA (cm)	NF	CONT (%)	OXI (%)
T1	1,11 a	1,4a	6 a	88 a
T2	1,61 a	3,8a	6 a	71 a
T3	1,5 a	3a	10 a	63 a

Médias seguidas na coluna por letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Figura 3. Aclimação de plântulas de mangaba.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o trabalho foi conduzido, pode-se concluir que para a conversão de embriões zigóticos maduros de mangabeira é dispensável a presença de ANA ou BAP no meio de cultura.

Os substratos com areia e pó da casca de coco seco (1:1) e vermiculita e areia (1:1) proporcionaram maior crescimento da parte aérea (2,2 e 2,8 cm), número de folhas (3,0 e 3,8) e número de nós (1,60 e 2,2) das plântulas de mangaba na fase de aclimação.

Estudos adicionais sobre o efeito da aclimação em plântulas de mangaba em diferentes combinações de substrato deverão ser conduzidos para indução de um sistema eficiente *ex vitro*, além da determinação do rendimento, avaliação do vigor das culturas e um protocolo eficiente de aclimação de mudas.

- 
1. ÁRVORES DO BRASIL. Disponível em: <[http://br.geocities.com/gilmara\\_basiliodossantos/arvoresdobrasil.html](http://br.geocities.com/gilmara_basiliodossantos/arvoresdobrasil.html)>. Acesso em: 01 de julho de 2008.
  2. BEZERRA, A. M. B.; ALCANFOR, D. C.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECO, R. Germinação de sementes de moringa (*Moringa oleifera* L.). *Ciência Agrônômica, Fortaleza*, v. 28, n. ½, p. 64-69, 1997.
  3. CAMPBELL, R.J. South American fruits deserving further attention. In: JANICK, J. (Ed.) *Progress in new crops*. Arlington: ASHS Press, 1996, p.431-439.
  4. COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I. K. (Ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. v. 1. New York: Academic Press, 1984. p. 241-257
  5. COSTA, M. A. P. de C.; ALMEIDA, W. A .B. de; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZA, F. V. Principais resultados com micropropagação de mangabeira na Bahia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracaju. *Anais...* Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM. Seção Palestras
  6. FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. *Anais...* UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p. 255-258.
  7. 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. (Orgs.). *Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial*. Recife: *Associação Plantas do Nordeste*, 2005. p. 49-100.
8. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1998. p. 183-260.
  9. GRIGOLETTO, E. R. *Micropropagação de Hancornia speciosa Gomez (Mangabeira)*. 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1997.
  10. HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. 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. v. 1. p. 371-393.
  11. LÉDO, Ana S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; JUNIOR, J. F. S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. *Lavras : Ciências Agrotécnicas*, v. 31, n. 4, 2007.
  12. LEMOS, E. E. P. de. Estratégias para a multiplicação clonal da mangabeira em Alagoas. In: SILPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. *Anais...* Aracaju: Embrapa-CPATC/MAPA, 2003. CD-ROM
  13. LEMOS, E. E. P. de; COSTA, M. A. P. de C.; ALOUFA, M. A. I.; LEDO, A. da S. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LEDO, A. da S. (Eds.). *A cultura da mangaba*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 125-133.
  14. 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.
  15. 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.
  16. NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55. 2001.
  17. PASSOS, E. E. M.; PASSOS, C. D. Influência da maturação o fruto na germinação da semente da mangaba. *Comunicado Técnico* 34, Aracaju, 2004.
  18. PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; ARAÚJO, I. A. de; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação por sementes. In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. da S. (Ed.). *A cultura da mangaba*. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 92-109.
  19. VIEIRA, D. Efeito de diferentes substratos na formação de mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 20, n. 3, p. 265-271, 1998.