



ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA CONSERVAÇÃO DE NONI EM BANCO DE GERMOPLASMA IN VITRO

ARTIGO ORIGINAL

SANTOS, Renan Pereira ¹

BARBOSA, Edilson Pinto ²

MALOSSO, Milena Gaion ³

SANTOS, Renan Pereira. BARBOSA, Edilson Pinto. MALOSSO, Milena Gaion. **Estabelecimento de meio de cultura para conservação de Noni em banco de Germoplasma in vitro.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 03, Ed. 10, Vol. 04, pp. 96- 105 Outubro de 2018. ISSN:2448-0959

RESUMO

A *Morinda citrifolia* L. é uma planta medicinal pertencente à família *Rubiaceae* e que é popularmente conhecida como Noni. O fruto de seu suco é rico em polissacarídeos imunodulatório contra tumores do tipo sarcoma denominada Noni-ppt e por isso, esta espécie vem sendo coletada indiscriminadamente de seu ambiente natural. Assim, o objetivo de estabelecer um meio de cultura para o armazenamento em crescimento lento visando a conservação de noni em banco de germoplasma *in vitro*, de conservar

¹ Trabalho de Iniciação Científica do discente do curso de Bacharelado em Biotecnologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

² Estatístico. Professor Doutor em Biotecnologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

³ Coordenadora do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Professora Doutora em Biotecnologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.



esta planta, o que é inédito para esta espécie. Para isso, explantes do tipo segmento nodal foram inoculados, respectivamente em meio de cultura B5 completo, bem como diluído pela metade e pela quarta parte, acrescidos de diversos reguladores osmóticos de crescimento. Após 180 dias mantidos em ambiente de armazenamento para crescimento lento, averiguou-se que o meio mais adequado para a manutenção desta espécie em banco de germoplasma *in vitro* à médio prazo foi o B5/2 acrescido de 2% de sacarose, 1,0 mg/L de BAP e 3,0 mg/L de IBA, que induziu o maior número de brotos por gema (1,47a), o maior número de gemas por haste (2,37a) e, consequentemente, a maior taxa de multiplicação (4.07a), além da total ausência de calos e altura do broto adequada às repicagens semestrais, quando comparado com os demais tratamentos utilizados para este experimento. Com isso, concluímos que é possível manter explantes do tipo segmento nodal em ambientes de armazenamento de crescimento lento, visando à conservação desta espécie em bancos de germoplasma *in vitro*.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*, *Morinda citrifolia* L, Planta Medicinal.

1. INTRODUÇÃO

Falar, hoje, de pesquisas da flora Amazônica é associá-las com acompanhamento da melhoria de vida da sociedade, atendendo às suas demandas e ampliando os conhecimentos existentes. Os recursos naturais existentes na Região Amazônica tornam-se conhecidos, gradativamente, à medida que a pesquisa científica se intensifica e os resultados são disponibilizados para a sociedade (PÁDUA, 2000).

A *Morinda citrifolia* L. é uma espécie que está à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e pelos frequentes desmatamentos provocados pelo homem nas áreas de ocorrência natural, visto que é uma planta medicinal pertencente à família *Rubiaceae* e que é popularmente conhecida como Noni (VASCONCELOS et al., 2014). O fruto de seu suco é rico em polissacarídeos imunodulatório contra tumores do tipo sarcoma denominada Noni-ppt (OLIVEIRA et al., 2011) e também já possui comprovada atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, anti-helmíntica, analgésica, hipotensiva, antiinflamatória e estimulante do sistema



imunológico (SILVA et al., 2014) e o suco de seu fruto é utilizado popularmente no tratamento de câncer, podendo torna-se uma ferramenta importante na prevenção desta doença.

No que se refere às ações de conservação de plantas medicinais, a adoção de técnicas biotecnológicas é de extrema importância, visto que estas são capazes de multiplicar e conservar plantas em laboratórios, de modo que torna-se desnecessário o uso de grandes áreas de solo para conservar a variabilidade genética de uma espécie vegetal (NASCIMENTO et al., 2012). Basicamente, existem duas formas de preservação permanente: conservação *in vivo* e *in vitro*. A primeira é realizada *habitat* natural da espécie, em áreas de preservação permanente e a segunda se faz com o estabelecimento de banco de germoplasma, aqui no caso *in vitro*, onde os propágulos são cultivados em meio de cultura estéril (LYRA et al., 2011), por longos períodos de tempos, em salas com características físicas de luminosidade, umidade e temperatura adequada, visando a conservação do germoplasma, que além de preservar a espécie, permite o acesso ao material genético para a caracterização, a domesticação, o desenvolvimento de novas variedades e prospecção de genes, revertendo em benefícios para toda sociedade (BUSTAMANTE e FERREIRA, 2011).

Coleções *in vitro*, em geral, são conservadas em bancos de germoplasma sob condições especiais protegidas de eventuais perdas, garantido a sua utilização a curto, médio e longo prazo (SILVA et al., 2012). O crescimento *in vitro*, durante o período de conservação, pode ser limitado por vários fatores físicos e químicos, tais como a redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, a diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e pelo uso de agentes químicos e osmóticos, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (OLIVEIRA et al., 2000).

Na conservação *in vitro*, os acessos são mantidos a temperaturas entre 12 a 20°C, de tal maneira a reduzir o crescimento e o número de subcultivos por ano (SILVA et al., 2012). Para a redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizados como estratégia as modificações das condições físicas com a temperatura ou químicas como o meio de cultura incluindo nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento (VETTORAZZI et al., 2017).



Antes do início dos procedimentos de rotina para a conservação de germoplasma a médio prazo, várias questões precisam ser analisadas. Os acessos devem ser avaliados quanto à variabilidade genética, pois o procedimento de conservação *in vitro* é oneroso, tornando impraticável manter amostras geneticamente similares ou muito próximas, além disso é de grande importância um conhecimento mínimo da biologia, da fisiologia e do ambiente de origem da espécie, o que, de modo geral, pode auxiliar na determinação de condições adequadas da conservação *in vitro* a médio prazo (GUIMARÃES et al, 2011), evitando, assim, a perda de diversidade genética.

Na conservação a curto e médio prazos, o material armazenado é subcultivado em intervalos regulares de no mínimo seis meses. Frequentemente, os períodos entre as subculturas devem ser os mais longos possíveis para diminuir a manipulação das plântulas e reduzir o risco de contaminação. É necessário mencionar que esta técnica é passível de erros técnicos e mudanças no genótipo devido à instabilidade genética apresentada por eventuais acessos. O objetivo do armazenamento do germoplasma a curto e médio prazos é definir condições experimentais para favorecer um crescimento mínimo sem alteração da estabilidade genética. (ALVES, 2010).

Plantas mantidas em banco de germoplasma tem baixa taxa de divisão celular (MARTINS, 2009), o que tende a diminuir a frequência de mutações que ocorrem durante a duplicação do DNA na fase mitótica do ciclo celular.

Contudo, o risco de tais mutações não pode ser totalmente excluído e as condições limitantes de crescimento podem introduzir um novo perigo: o inevitável estresse fisiológico. É importante que os procedimentos aplicados para minimizar o crescimento também sejam capazes de manter o máximo da viabilidade da cultura (SILVA e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

O Noni tem um grande potencial como fitoterápico, mas ainda não pode ser incluída em programas de produção em larga escala de fitomedicamentos, uma vez que ainda não há estudos fitotécnicos que permitam a rápida multiplicação desta espécie e, conseqüentemente, a produção de biomassa vegetal suficiente para uso como fonte sustentável de princípios ativos empregados pela indústria farmacêutica, o que pode



levar esta espécie à extinção, caso ocorra à coleta indiscriminada em seu *habitat* natural. Considerando a gravidade deste problema, no momento em que a humanidade está preocupada em conservar a biodiversidade do planeta, a proposta de estabelecer um banco de germoplasma *in vitro* a partir de métodos biotecnológicos objetivando encontrar um meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro* é uma atitude concreta de preservação para a utilização desta espécie medicinal que começa a ser cultivada comercialmente no interior do Estado do Amazonas – Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento de meio de cultura para a conservação de *Morinda citrifolia* L. em banco de germoplasma *in vitro*, plântulas mantidas em sala de crescimento com 4,0 cm de altura foram utilizadas nesse experimento. Os frascos utilizados foram tubos de ensaio e os meios de cultura estão descritos a seguir:

B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA

B5/2 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA

B5/4 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA

B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 4% de sorbitol

B5/2 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 4% de sorbitol

B5/4 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 4% de sorbitol

B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 3% manitol

B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 3% manitol

Os tubos de ensaio foram mantidos por 180 dias em estufa com característica de banco de germoplasma, ou seja, temperatura de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5\%$ de umidade relativa e 16h de fotoperíodo com intensidade luminosa de $2.0 \times 10^7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, provenientes



de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W), quando então foram avaliadas quanto ao número de brotos por gema, número de gemas por haste, taxa de multiplicação, altura dos brotos e presença de calos e raízes.

O delineamento experimental deste experimento foi o inteiramente casualizado e para a comparação das médias dos tratamentos foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de 5%. Para este trabalho foram utilizados 30 explantes por tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, o tratamento constituído pelo meio de cultura B5/2 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L de BAP induziu o maior número de brotos por gema (1,47a), o maior número de gemas por haste (2,37a) e, conseqüentemente, a maior taxa de multiplicação (4,07a), além de não induzir calos e produzir plântulas com a altura adequada às necessidades da periodicidade de repicagem da técnica de banco de germoplasma.

Tabela 1. Estabelecimento de meio de cultura para a conservação de noni em banco de germoplasma *in vitro*.

Tratamento s	Nº de broto s por gema *	Nº de gemas por haste* *	Taxa de multiplicação*x **	Altura do Broto (cm)	Presenç a de calos (%)	Presenç a de raiz (%)
B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA	0,90b	1,13bc	1,63bc	0,71ab	0,53bc	0,10b
B5/2 + 2% de sacarose +	1,47a	2,37a	4,07a	1,15ab	0,00d	0,00b



1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA						
B5/4 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA	0,93b	1,70ab	2,03b	1,74a	0,57bc	0,63a
B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 4% de sorbitol	0,33c d	0,57cd	0,60cd	0,28bc d	0,40c	0,00b
B5/2 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 4% de sorbitol	0,10d	0,13d	0,13d	0,06bc d	1,00a	0,03b
B5/4 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA +	0,30c d	0,43cd	0,50cd	0,19bc d	0,53bc	0,23b



4% de sorbitol						
B5+2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 3% manitol	0,57b d	1,27bc	1,40bcd	1,57a	0,77ab	0,60a
B5/2 + 2% de sacarose + 1,0 mg/L BAP + 3,0 mg/L IBA + 3% de monitol	0,60b c	1,13bc	1,13bcd	1,00ab	0,70ac	0,57a

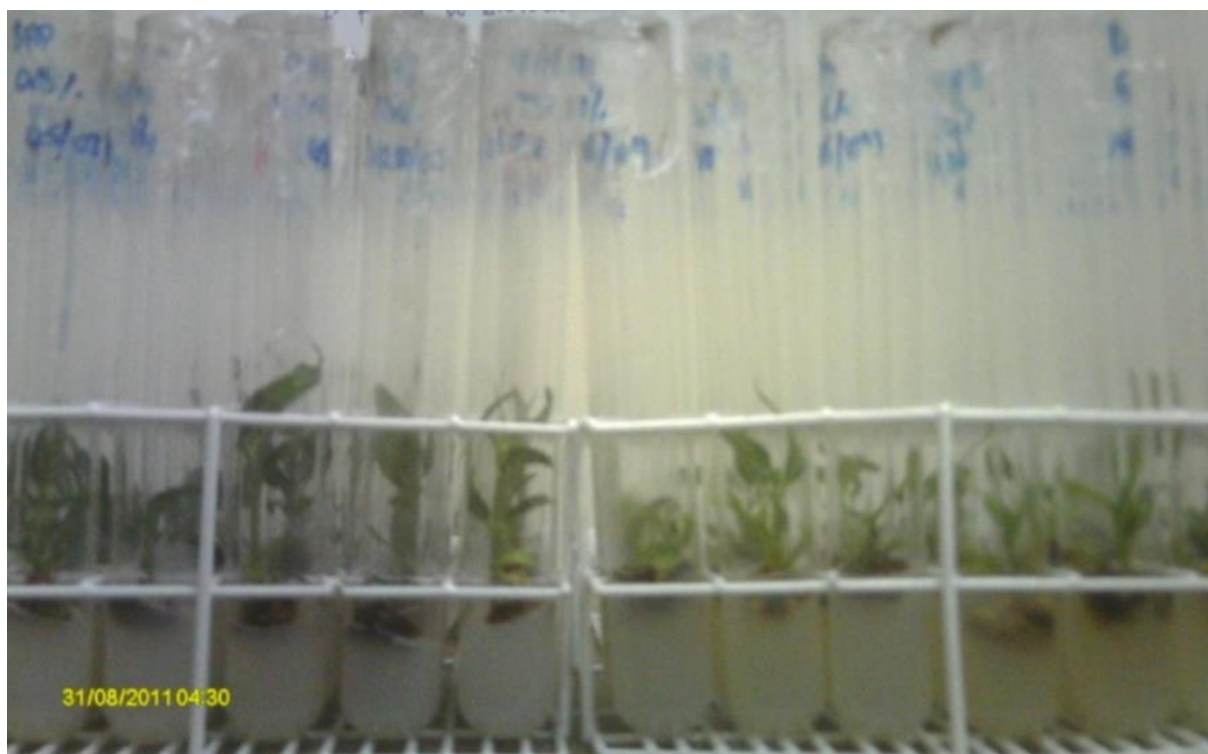
A taxa de multiplicação é dada pelo número de brotos por gema* x o número de gemas por haste**.

O grande problema em se estabelecer segmentos nodais de espécies tropicais em bancos de germoplasma *in vitro* é que estas plantas são habituadas a altas temperaturas, grande disponibilidade de nutrientes e de água (MARTINS et al., 2009). As condições de baixas temperaturas dos ambientes de banco de germoplasma, bem como a baixa disponibilidade de nutrientes e também a adição de altas concentrações de reguladores de crescimento osmótico ao meio de cultura podem sem dúvida, prejudicar o crescimento dose explantes (ALVES, 2010). Além disso, alterações ambientais como baixas temperaturas, e a pouca disponibilidade de nutrientes e água podem sem dúvida levar os explantes à morte. E, por isso, é muito difícil encontrar um meio de cultura para a conservação de espécies florestais tropicais em bancos de germoplasma *in vitro*. No entanto, Bertoni et al. (2007) e Preczenhak (2014), entre outros, também conseguiram estabelecer em banco de germoplasma *in*



vitro, respectivamente, as espécies tropicais *Zeyheria montana* e *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Neste trabalho, conseguimos encontrar um meio de cultura capaz de manter explantes de noni verdes e vigorosos após 180 dias de submissão às condições de banco de germoplasma, como pode ser visto na Figura 1, abaixo:



Fonte: autor

Figura 1. Plântulas de Noni crescidas durante 180 dias em ambiente de banco de germoplasma.

O meio de cultura aqui estabelecido induziu as melhores características observadas durante o desenvolvimento deste experimento, além de não produzir calos, o que é uma característica importante quando se pretende manter explantes em banco de germoplasma, justamente porque estes acessos possuem algum caráter econômico e/ou agrônômico de interesse, tal como a presença de um gene resistente a uma doença e/ou várias, de produção de frutos mais doces, maiores ou carnosos, de resistência de estresse hídrico ou salínico, entre muitos outros exemplos e a indução



de calos pode levar à variação somaclonal, que em tese, pode levar justamente a perda desses genes de interesse (CALVETE et al, 2009; ULISSES et al, 2000). Embora o tratamento aqui indicado não tenha produzido raízes, este fato é muito comum na presença de agentes osmóticos retardantes de crescimento, sendo necessária a posterior adição de poliaminas como, por exemplo, a putrescina ou a espermidina visando o enraizamento da planta (SOUZA et al, 2011). Ainda na Tabela 1, pode-se verificar que o tratamento supracitado induziu a maior altura do brotos, o que não é interessante para plântulas mantidas em ambiente de banco de germoplasma, uma vez que o objetivo é transferi-las para meio fresco no mínimo a cada seis meses e, plântulas que crescem muito necessitam de repicagem antes do término deste período. No entanto, as plântulas de noni no tratamento aqui indicado cresceram apenas 1,15 cm, o que é uma excelente taxa de crescimento lento, já que os tubos de ensaio possuem, em média, 15,5cm de altura e levaria um pouco mais de 13 meses para chegar ao topo do tubo e requerer nova repicagem.

Assim, com este trabalho, concluímos que é possível manter plântulas em ambiente de banco de germoplasma, em crescimento lento, utilizando o meio de cultura aqui indicado.

4. CONCLUSÃO

A viabilidade da técnica de conservação em banco de germoplasma *in vitro* é viável e assim, representa mais uma alternativa agrícola capaz de reduzir o impacto ambiental, restringindo o desmatamento e promovendo o desenvolvimento sustentável.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.B.N.; BERTONI, B.W.; VIEIRA, R.F.; FRANÇA, S.C.; MING, L.C.; PEREIRA, AM.S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.4, p.510-515, 2010.



BERTONI, B. W.; ASTOLFI-FILHO, S.; MARTINS, E. R.; DAMIÃO-FILHO, C. F.; FRANÇA, S. de C.; PERIERA, A. M. S.; TELLES, M. P. de C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Genetic variability in natural populations of *Zeyheria Montana* Mart. from the Brazilian cerrado. **Scientia Agricola**, v.64, n.4, p.409-415, 2007.

BUSTAMANTE, P. G. e FERREIRA, F. R. Accessibility and Exchange of plant germplasm by Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** S1, p. 95 – 98, 2011.

CALVETE, E. O.; GRANDO, M. F.; GOMIDA, D. G.; MARN, R. E.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D. Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 943-949, 2009.

GUIMARÃES, M. de A.; MANDELLI, M. S.; SILVA, D. J. H. Seleção de genótipos de *Lactuca sativa* L. para a produção com adubação orgânica. **Revista Ceres**, v. 58, n.2, p. 202-207, 2011.

LYRA, D. H.; SAMPAIO, L. S.; PEREIRA, D. A.; AMARAL, C. L. F. Conservação *on farm* da agrobiodiversidade de sítios familiares em Jequié, Bahia, Brasil. **Revista Ceres**, v. 58, n.1, p. 69 – 76, 2011.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.071-076, 2009.

NASCIMENTO, M. M. do ; FERREIRA, M. A. C. ; MALOSSO, M. G. . Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* CHAM.) em sistema de imersão temporária automatizado com biorreatores do tipo R.I.T.A. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** (Impresso), 2012.

OLIVEIRA, K. P.; BATISTA, D. S.; SOUZA, D. C. F.; BENEDITO, C. P.; RIBEIRO, M. C. C. Desponte e embebição em sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, especial, p.513-517, 2011.



OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O.; SILVA, K. M.; SILVEIRA D. G. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.245-249, 2000.

PÁDUA, J. A. Biosfera, história e conjuntura na análise da questão amazônica. **História, Ciência e Saúde-Manguinhos**. v. VI (suplemento), p. 793 – 811, 2000.

PRECZENHAK, A. P.; RESENDE, J. T. V.; CHAGAS, R. R.; SILVA, P. R.; SCHWARZ, K.; MORALES, R. G. F. Caracterização agrônômica de genótipos de minitomate. **Horticultura brasileira**, v. 33, n. 2, 2014.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.3, p.344-350, 2012.

SILVA, T. L. e SCHERWINSKI-PEREIRA, E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.4, p.384-389, abr. 2011.

SILVA, J. J. M.; CAVALCANTE, L. F.; NASCIMENTO, J. A. M.; DINIZ, L. M. T.; SOUTO, A. G. L. Esterco bovino e potássio na composição mineral de plantas de noni. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, 2014.

SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C. PEREIRA, A.M.S. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.3, p.319-327, 2011.

ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P. S. G. DA; ALBUQUERQUE, C. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira “nanicão” tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.667-670, out./dez. 2000.

VASCONCELOS, R. S.; MIRANDA, F. R.; SOUSA, J. A. Desenvolvimento de noni (*Morinda citrifolia* L.) sob diferentes sistemas e lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v. 16, n. 2, supl. I, p. 388-397, 2014.



MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC JOURNAL

**NÚCLEO DO
CONHECIMENTO**

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR NÚCLEO DO
CONHECIMENTO ISSN: 2448-0959

<https://www.nucleodoconhecimento.com.br>

VETTORAZZI, R. G.; CARVALHO, V. S.; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R. Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 359-367, 2017.

Enviado: Agosto, 2018.

Aprovado: Outubro, 2018.