



ISSN 1677-8618
Junho, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 44

Resposta de tecidos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de auxina e meio líquido

Maria das Graças Rodrigues Ferreira

Porto Velho, RO
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO
Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela P. Maciel*

Edição eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão: 2007, tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Ferreira, Maria das Graças Rodrigues
Resposta de tecidos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*
Schum.) à concentração de auxina e meio líquido. / Maria das Graças
Rodrigues Ferreira. – Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.
11 p. il. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa
Rondônia, ISSN 1677-8618; 44).

1. Cupuaçu. 2. Cultura de tecidos. I. Título. II. Série.

CDD 634.65
© Embrapa – 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	8
Resultados e discussão	8
Conclusões	10
Referências	11

Resposta de tecidos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de auxina e meio líquido

*Maria das Graças Rodrigues Ferreira*¹

Resumo

Objetivou-se estudar o efeito da concentração de auxina e do meio líquido sobre o desenvolvimento de calos de cupuaçuzeiro. Segmentos de eixos embrionários e cotilédones, obtidos de frutos de cupuaçu dos tipos Mamorana e Redondo, foram cultivados em 4 meios de cultura diferentes: 1) meio MS (50%), suplementado com 2,4-D (1; 2; 4; 8 mg/L); 2) sais N6 (SIGMA) (4 g/L), acrescidos de 2,4-D (0; 2; 4 mg/L) e ANA (0; 3; 5 mg/L); 3) igual ao anterior suplementado apenas com ANA (3 mg/L) e 4) meio MS, acrescido com ANA (1 mM). Calos com aspecto branco e brilhante foram observados em segmentos de eixos embrionários e cotilédones, cultivados nas menores concentrações de meio 1 (1 e 2 mg/L), enquanto que nas maiores concentrações (4 e 8 mg/L) observou-se a formação de calos e massa calosa branco opaca, em eixos embrionários e em segmentos cotiledonares, que tornaram-se escuros dentro de oito semanas. Usando o meio 2, um grande número de raízes foram formadas, enquanto que o mesmo meio suplementado apenas com ANA (3; 5 mg/L) originou uma massa calosa. A combinação de ANA e 2,4-D, 3 e 2 mg/L respectivamente, promoveu a formação de calos brancos e raízes em segmentos de hipocótilo. A transferência das culturas para meio líquido, sem regulador de crescimento, promoveu aumento de tamanho dos explantes e escurecimento dos mesmos. O cultivo desses explantes no meio 3 resultou no aparecimento de calos amarelos, com aspecto friável, que permaneceram com a mesma aparência no meio 4.

Palavras-chave: cultura de tecidos, calos, auxina.

¹ Eng. Agrôn., D.Sc., Pesquisadora, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br.

Response of *Theobroma grandiflorum* Schum. tissues to auxin concentration and liquid medium

Abstract

It was studied the effect of auxin concentration and liquid medium on the development of cupuassu calli. Cupuassu embryonic axes segments and cotyledons, from kinds Mamorana and Redondo, were cultivated in four different culture media: 1) MS medium (50%) supplemented with 2,4-D (1; 2; 4; 8 mg/L); 2) N6 salts (SIGMA) (4 g/L) supplemented with 2,4-D (0; 2; 4 mg/L) and NAA (0; 3; 5 mg/L); 3) similar to the previous medium supplemented only with NAA (3 mg/L) and, 4) MS medium, supplemented with NAA (1 mM). Calli with white and bright aspect were observed in embryonic axes and cotyledons, cultivated in the smallest concentrations of medium 1 (1 and 2 mg/L), while in the largest concentrations (4 and 8 mg/L) opaque white calli and calli mass were formed in embryonic axes and in cotyledons segments, these structures became brownish within eight weeks. Using medium 2, a great number of roots were formed, while this same medium supplemented only with NAA (3; 5 mg/L) originated a calli mass. The presence of NAA and 2,4-D, 3 and 2 mg/L respectively, promoted the formation of white calli and roots. The transfer of the explants to liquid medium, without growth regulator, promoted an increase of explants size and browning of them. The cultivation of those explants in medium 3 resulted in the formation of yellow calli, with friable aspect, that stayed with kept the same aspect in the medium 4.

Key words: tissue culture, calli, auxin.

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore frutífera, pertencente à família das Sterculiaceas, que encontra-se disseminada por toda a Bacia Amazônica, sendo esporadicamente encontrada em outros países como a Colômbia, Venezuela, Equador e Costa Rica (VENTURIERI et al., 1985). O maior valor da espécie está na polpa, que se encontra aderida às sementes, é de cor branca-amarelada, sabor ácido e cheiro agradável característico, sendo utilizada *in natura* ou na fabricação de néctar enlatado, sorvetes, licores, compotas, geléias, iogurtes, etc (CALZAVARA et al., 1984; VENTURIERI et al., 1985). Da semente obtém-se produto semelhante ao chocolate, caseiro ou industrial, de finíssima qualidade, que no caso, recebe o nome de cupulate. Tal tecnologia para obtenção do cupulate foi desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, em estudos conduzidos por Nazaré et al. (1990). A amêndoa entra na composição de chocolate branco e a manteiga está sendo requisitada pela indústria de cosméticos; já a casca vem sendo aproveitada como adubo orgânico e na fabricação de bijuterias.

O cupuaçuzeiro, mesmo quando propagado por via sexuada, apresenta características de precocidade de frutificação, motivo pelo qual a propagação vegetativa não é estritamente necessária para a redução do período de juvenilidade ou mesmo para redução do porte da planta. Assim, a propagação vegetativa tem como objetivo principal a reprodução de genótipos com características superiores, tais, como: produtividade, características tecnológicas do fruto e resistência a doenças (MÜLLER; CARVALHO, 1997), como a vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*), principal doença da cultura.

Instituições de pesquisas na Região Norte têm implementado programas de melhoramento com ênfase à seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*), principal doença da cultura. A Embrapa Amazônia Oriental recomenda os clones Coari, Codajás, Manacapuru e Belém aos produtores de regiões da Amazônia localizados em área de clima tropical quente e úmido, sem período seco definido, podendo ser plantado no início do período chuvoso. Por apresentar problemas de incompatibilidade (formação de frutos) entre dois clones (Coari e Codajás), alguns cuidados devem ser tomados no plantio: a) plantar os quatro clones na mesma área; b) misturar as mudas dos clones na linha de plantio para que mudas do mesmo clone não fiquem de fora (CRUZ; ALVES, 2002).

Certas espécies de plantas são recalcitrantes à obtenção de calos em quaisquer tipos de explantes, sendo que algumas gramíneas e muitas espécies lenhosas só produzem calos quando são empregadas doses altíssimas de auxinas no meio de cultura (Damião Filho, 1995). Singha (1982) observou aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pelos explantes, quando estes foram colocados em meios líquido e semi-sólido.

Pierik (1987) afirmou que os melhores resultados obtidos nestes meios devem-se à maior facilidade de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e também devido ao maior contato entre explante e meio, ao contrário de meios mais sólidos, onde há somente contato basal. Os meios líquidos também permitem melhor diluição de exsudatos oriundos do explante, evitando, desta forma, o acúmulo de compostos tóxicos.

Os estudos de propagação *in vitro* para o gênero *Theobroma* têm-se limitado à espécie *Theobroma cacao* L., considerada até há pouco tempo como a única espécie do gênero cultivada comercialmente. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da concentração de auxina e do meio líquido sobre o desenvolvimento de calos de cupuaçu.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Biologia Aplicada, pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Foram utilizados como fonte de explantes, eixos embrionários e cotilédones, obtidos de sementes de frutos imaturos de cupuaçu. As sementes foram imersas em solução de 20% de hipoclorito de sódio (alvejante comercial), contendo 1% a 1,5 % de cloro ativo (alvejante comercial) durante 10 minutos, seguindo-se três lavagens com água bidestilada. Em condições assépticas, os cotilédones foram segmentados e os eixos embrionários das sementes foram divididos em: região da plúmula, radícula e hipocótilo.

Esses explantes foram esterilizados com solução Ao (antioxidante), contendo 10 ml de solução Ao - composta de ácido ascórbico (15 mg/L), cisteína (40 mg/L) e AgNO₃ (2 mg/L) - 30 mL de alvejante comercial, 60 mL de água destilada e 3 gotas de Tween 20, ficando imersos nesta solução por 1 hora. Posteriormente, os explantes foram imersos numa solução de 9 mL LS (sais e vitaminas MS) + 1 mL de Ao por dez minutos, cultivados em placas de Petri descartáveis e as culturas mantidas em sala de crescimento, com temperatura variando de 24 a 28° C em condições de escuro. Para cada condição, foram feitas 10 repetições empregando-se os seguintes meios: **meio 1:** (50%) sais MS (2,15 g/L) sacarose (60 g/L), água de coco (100 mL/L), 2,4-D (1; 2; 4; 8 mg/L), cinetina (0,5 mg/L), gelrite (2,5 mg/L) e pH 5,3 antes da autoclavagem; **meio 2:** sais N6 (4 g/L), acrescidos de vitaminas N6 (1000 x) (1 mL/L), sacarose (20 g/L), caseína hidrolizada (100 mg/L), 2,4-D (0; 2; 4 mg/L), ANA (0; 3; 5 mg/L), água de coco (50 mL/L), phytigel (2,5 g/L) e pH 5,8; **meio 3:** igual ao meio anterior suplementado apenas com ANA (3 mg/L); **meio 4:** (100%) sais MS (4,30 g/L), acrescidos de vitaminas LS (1 mL/L), sacarose (60 g/L), inositol (100 mg/L), ANA (1 mM), phytigel (3,0 g/L), pH 5,8.

Resultados e discussão

Após 6 semanas, calos foram observados em segmentos de eixos embrionários no meio 1, em todas as concentrações de 2,4-D testadas, com ênfase para a região do hipocótilo. Explantes cultivados nas concentrações menores de 2,4-D (1 e 2 mg/l) apresentaram calos com aspecto branco e brilhante (Fig. 1A, B), enquanto aqueles cultivados nas maiores concentrações (4 e 8 mg/l) apresentaram um aumento distinto de tamanho, boa formação de calos brancos, com partes amareladas, aspecto gelatinoso, que secaram após alguns subcultivos (Fig. 1C, D).

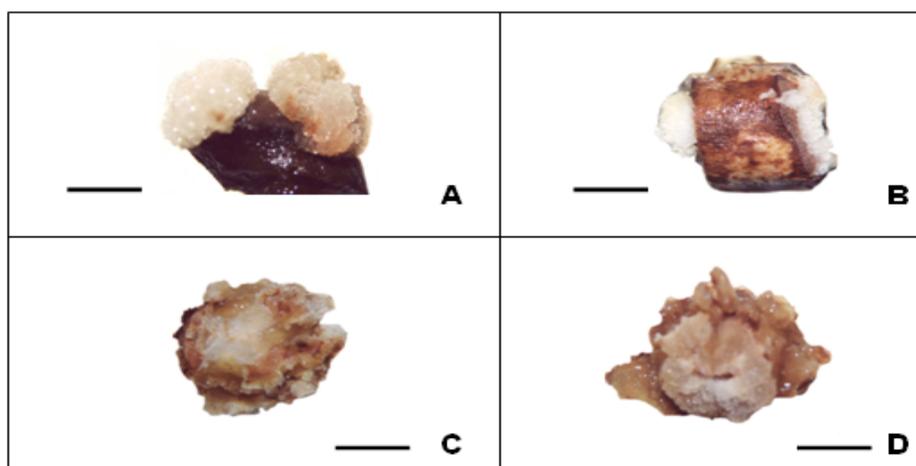


Fig. 1. Calos da região do hipocótilo de eixo embrionário de cupuaçu desenvolvidos em meio com 2,4-D. A) Calos da região do hipocótilo cultivados com 1 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,6 cm); B) cultivados com 2 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,7 cm); C) cultivados com 4 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,4 cm); D) Calos da região do hipocótilo cultivados com 8 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,6 cm).

Janick (1986) afirmou que altas concentrações de 2,4-D mais água de coco estimulam a produção de calo e anulam a indução de embrião. Para segmentos cotiledonares, nas concentrações menores de 2,4-D, os explantes ficaram cobertos por calos grandes, brancos e brilhantes (Fig. 2A, B), que ficavam amarelados, enquanto que nas concentrações mais altas (4 e 8 mg/L) houve apenas a formação de massa calosa branca, seguida de escurecimento (Fig. 2C, D).

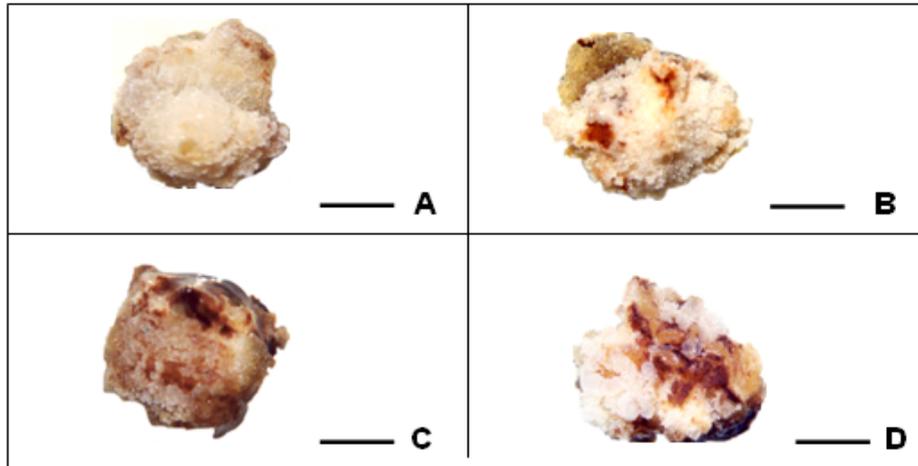


Fig. 2. Segmentos de cotilédone de cupuaçu desenvolvidos em meio com 2,4-D. A) Segmentos cotiledonares cultivados com 1 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,6 cm); B) Segmentos cotiledonares cultivados com 2 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,6 cm); C) Segmentos cotiledonares cultivados com 4 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 1,1 cm); D) Segmentos cotiledonares cultivados com 8 mg/L de 2,4-D (barra horizontal = 0,6 cm).

Após 8 semanas, verificou-se o escurecimento e morte dos calos em todas as concentrações empregadas, o que poderia ser atribuído à combinação de 2,4-D com água de coco. Estes resultados concordam com os de Kononowicz et al. (1984), que empregando embriões zigóticos imaturos de cacau, observaram escurecimento e morte dos calos, em resposta à combinação de água de coco e 2,4-D acima de 2 mg/L.

Após 6 semanas no meio 2, notou-se a presença de raiz em segmentos de hipocótilo, no meio sem regulador de crescimento, e calos em segmentos radiculares (Fig. 3A, B). Estes efeitos podem ser devidos à presença de água de coco no meio de cultura. Legrand et al. (1984) concluíram que a água de coco favoreceu a rizogênese e calogênese em hipocótilo de plântulas de cacau, com emprego de meio básico, sem regulador de crescimento. Calos brancos friáveis foram observados em todos os outros meios empregados, sendo estes mais pronunciados também na região do hipocótilo. Os meios que continham apenas ANA (3; 5 mg/L) apresentaram o maior número de raízes acompanhados de massa calosa (Fig. 3C, D) enquanto os meios que continham ANA e 2,4-D (3; 2 mg/L) apresentaram calos brancos e raízes (Fig. 3E).

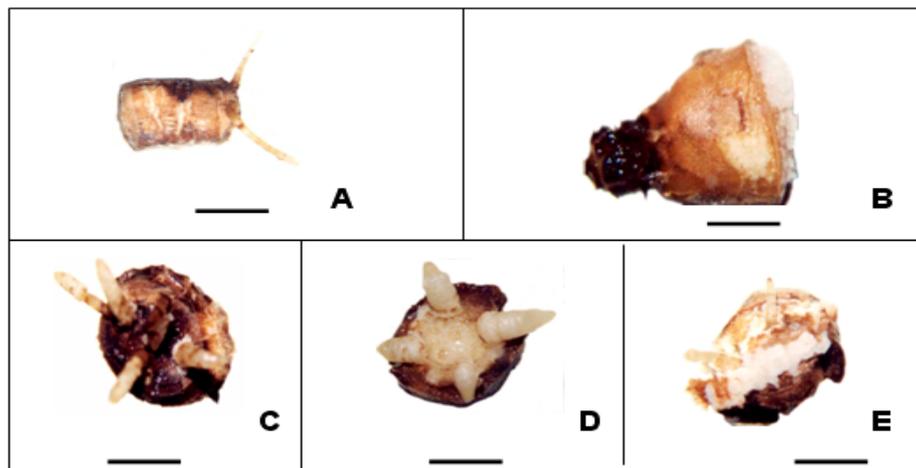


Fig. 3. Segmentos de eixo embrionário de cupuaçu cultivados em meio com 2,4-D e ANA. A) Segmento de hipocótilo cultivados em meio sem regulador de crescimento (barra horizontal = 8,0 cm); B) Segmento de raiz cultivado em meio sem regulador de crescimento (barra horizontal = 8,0 cm); C) Segmento de hipocótilo cultivado em meio contendo ANA 3 mg/L (barra horizontal = 7,0 cm); D) Segmento de hipocótilo contendo ANA 5 mg/L (barra horizontal = 0,4 cm); E) Segmento de hipocótilo contendo ANA e 2,4-D (3; 2 mg/L) (barra horizontal = 1,0 cm).

Com cotilédones também houve indução de calos, que escureceram e secaram, não sendo evidenciado nenhum calo embriogênico nestes meios. Os calos foram subcultivados a cada 15 dias nestes meios e, após um mês, foram transferidos para meio líquido, sem regulador de crescimento, a fim de estimular o aparecimento de estruturas embriogênicas. Ranch (1993) afirmou que a maturação em meio líquido facilitaria a pronta conversão de maior número de embriões somáticos. As culturas foram dispostas em frascos Erlenmeyer, os quais foram mantidos sob agitação contínua em agitador a 120 r/min, intercalando luz e escuro. Após três dias nestas condições, observou-se aumento de tamanho dos explantes, bem como escurecimento dos mesmos. Após 15 dias nestas condições, as culturas foram transferidas para um meio sólido, no caso o meio 3, empregando-se 3 mg/L de ANA, com o objetivo de estimular o aparecimento de estruturas embriogênicas. Apesar do escurecimento dos explantes, três semanas após observou-se o aparecimento de calos amarelos, com aspecto friável (Fig. 4A, B). Estes resultados também foram obtidos por Figueira e Janick (1993), empregando tecido nucelar de cacau como explante. As culturas foram mantidas nesse meio durante 5 semanas sendo, em seguida, transferidas para um meio de regeneração, o meio 4. As culturas foram subcultivadas a cada sete dias neste meio e, após um mês, observou-se que os calos permaneceram indiferenciados.

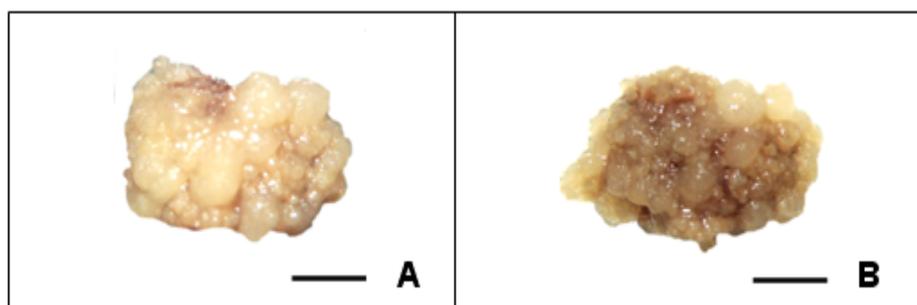


Fig. 4. Calos de cupuaçu cultivados em meio com ANA. A, B) Calos friáveis após 3 semanas de cultivo (barra horizontal = 1,2 cm).

Conclusões

- A região do hipocótilo do eixo embrionário de cupuaçu apresentou maior calosidade.
- As maiores concentrações de 2,4-D (4 e 8 mg/L) promoveram bom desenvolvimento de segmentos de eixos embrionários, acompanhados de calos brancos.

- ANA promoveu o aparecimento de raízes e formação de massa calosa.
- A combinação de ANA e 2,4-D (3; 2 mg/L) promoveu o aparecimento de raízes e calos brancos em segmentos de hipocótilo.
- A água de coco favoreceu a rizogênese e calogênese em meio sem reguladores.
- O meio líquido favoreceu o aparecimento de calos friáveis.

Referências

- CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, H. M.; KAHWAGE, O M. da C. **Fruticultura Tropical: o cupuaçuzeiro, cultivo, beneficiamento e utilização do fruto.** Belém: Embrapa/CPATU, 1984. p. 1-110. (Embrapa-CPATU. Documentos, 32).
- CRUZ, E. D.; ALVES, R. M. **Clones de cupuaçuzeiro tolerantes à vassoura-de-bruxa.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2002. 4 p. (Folder).
- DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação.** Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 336, p. 231-38, 1993.
- JANICK, J. Embryogenics: the technology of obtaining useful products from the culture of asexual embryos. In: CROCOMO, O. J. (Ed.). **Biotechnology of plants and microorganisms.** Ohio: State University Press, 1986. p. 97-117.
- KONONOWICZ, H.; KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. Asexual embryogenesis via *callus* of *Theobroma cacao* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 113, n. 4, p. 347-358, 1984.
- LEGRAND, B.; CILAS, C.; MISSISSO, E. Comportement des tissus de *Theobroma cacao* L. var. Amelonado cultivés *in vitro*. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 245-250, 1984.
- MÜLLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. Sistemas de propagação e técnicas de cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA - DO -REINO E CUPUAÇU, 1., 1996, Belém, PA. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997. 440 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).
- NAZARÉ, R.F.R. de; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. **Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate.** Belém: Embrapa-CPATU, 1990. 38p. (Embrapa-CPATU. Boletim de pesquisa, 108).
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344 p.
- RANCH, P. J. The potential for synthetic soybean seed. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). **Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement.** Florida: CRC PRESS, 1993. p. 329-51.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. "Almey" and *Pyrus communis* "Seckel". **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 4, p. 657-660, 1982.
- VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. **Informativo SBF**, Itajaí, v. 4, n.1. 1985.