

Calogênese *in vitro* em diferentes explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)

Ana da Silva LEDO¹; Osmar Alves LAMEIRA²; Abdellatif K. BENBADIS³; Elisa Ferreira MOURA²

¹Embrapa Acre, caixa postal 392, CEP 69901-180, Rio Branco-AC, E-mail: analedo@uol.com.br;

²Embrapa Amazônia Oriental, caixa postal 48, CEP 66017-970, Belém-PA; ³Universidade Federal do Ceará, Campus do PICI, Departamento de Fitotecnia, CEP 60020-181, Fortaleza-CE.

Introdução

Plantios desuniformes associados a falta de material genético melhorado tem sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) na Amazônia.

Para atender esta demanda, instituições de pesquisas na região, nos últimos anos, tem implementado programas de melhoramento com ênfase a seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*), principal enfermidade da cultura. Neste contexto, a cultura de tecidos, em especial a micropropagação, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se uma técnica auxiliar muito valiosa para clonagem, a curto prazo, de genótipos superiores e para acelerar programas de melhoramento genético.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar o comportamento e as respostas morfogênicas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro submetidos à várias condições de cultura *in vitro*.

Metodologia

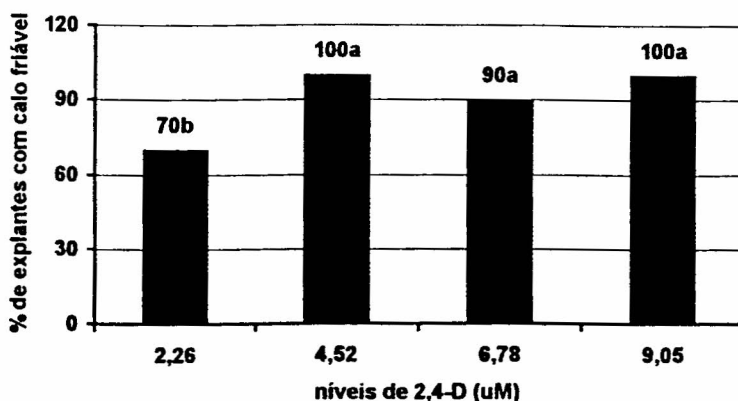
Para o estudo do comportamento e das respostas morfogênicas de explantes de cupuaçuzeiro, foram utilizados explantes obtidos a partir de plântulas assépticas obtidas *in vitro* (segmento caulinar e folhas jovens) e de embriões zigóticos (eixo embrionário e cotilédones) obtidos de plantas adultas da coleção de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

Todos os explantes foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com 0,6 % de ágar e 3 % de sacarose, sendo que os reguladores de crescimento foram adicionados ao meio de cultura da seguinte forma: Eixos embrionários: ácido naftalenoacético-ANA (10,74; 21,48; 32,22 e 42,96 μM); ácido 2,4-diclorofenoxiacético -2,4-D (2,26; 4,52; 6,78 e 9,05 μM) e tidiazuron-TDZ (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μM); Segmentos de folhas jovens TDZ (0; 1,0; 2,0 e 3,0 μM) combinado com 2,4-D (0; 9,05; 18,10 e 27,15 μM); segmentos cotiledonares : 6-furfurilaminopurina-KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 μM) combinado com ANA (5,37 μM) ou 2,4-D (2,26 μM); e Segmentos caulinares: KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 μM) combinados com ANA (5,37 μM) ou 2,4-D (2,26 μM).

Nos primeiros 15 dias as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura variando de $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70%, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta ($6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância) / oito horas de escuro e, posteriormente, foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria direta ($52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/oito horas no escuro.

Resultados e Discussão

Nos eixos embrionários cultivados em meio com diferentes concentrações de ANA e TDZ, não foi observada a iniciação de calos friáveis e de estruturas pró-embriogênicas até os 120 dias de cultura. Entretanto, na presença de 2,4-D, após a formação do calo não friável aos 25 dias de cultura, foi observada a iniciação e o crescimento de calo com aspecto friável em toda a superfície dos explantes. As maiores frequências de calos friáveis foram verificadas, aos 30 dias, em explantes cultivados em meio suplementado com 4,52; 6,78 e 9,05 μM de 2,4-D (Figura 1).

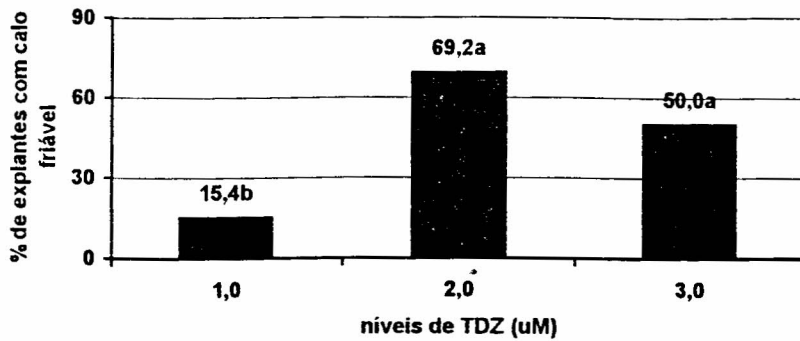


Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente entre si, ao nível de 1% pelo agrupamento de Scott & Knott. CV= 19,64 %

FIGURA 1. Percentagem de eixos embrionários de *Theobroma grandiflorum* com calo friável em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, Brasil, 2001

Na presença isolada de 1,0; 2,0 e 3,0 μM de TDZ, após a formação de calo de aspecto não friável, aos 15 dias de cultura, foi observada a iniciação e o rápido crescimento de calo friável de coloração clara em toda a superfície abaxial e adaxial de segmentos foliares. Os níveis de 2 e 3 μM de TDZ induziram as maiores frequências de explantes com calos friáveis aos 45 dias de cultura (Figura 2). Segundo Lu (1993) o TDZ estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento de calos dependentes de citocininas em algumas espécies.

A combinação de ANA e KIN, nas concentrações testadas, foi bastante favorável a indução da rizogênese em segmentos cotiledonares. Pence et al. (1979) verificaram o crescimento organizado de raízes a partir de cotilédones de cacau, em meio MS suplementado com 20 mg.L^{-1} de ANA. Resultados semelhantes foram obtidos por Ndoumou et al. (1997), em cotilédones de cacau, que observaram o rápido crescimento de calos em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 2,4-D e KIN. O tratamento constituído de 2,26 μM de 2,4-D combinado com 13,94 μM de KIN foi o único a induzir a formação de calos friáveis em segmentos caulinares, entretanto com crescimento muito lento e rápido escurecimento.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente entre si, ao nível de 1 % pelo agrupamento de Scott & Knott. CV = 24,17 %

FIGURA 2. Percentagem de explantes foliares de *Theobroma grandiflorum* com calo friável sob diferentes concentrações de TDZ aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, Brasil, 2001

Conclusões

O 2,4-D (4,52; 6,78 e 9,05 μ M) e o TDZ (2,0 e 3,0 μ M), estimulam o rápido crescimento de calos friáveis em eixos embrionários e segmentos de folhas jovens, respectivamente. A combinação de ANA e KIN promove a rizogênese em segmentos cotiledonares. A presença de 2,4-D e KIN no meio de cultura promove a formação de calos friáveis e de ANA e KIN induz a rizogênese em segmentos de cotiledonares.

Referências bibliográficas

- LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. *In Vitro, Cellular and Developmental Biology Plant*, Oxon, United Kingdom, v.29, n.2, p.92-96, Apr.-Jun.1993.
- 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.
- NDOUMOU, D.O.; NDZOMO, G.T.; NIEMENAK, N. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum*, Prague, v.39, n.3, p.337-347, Jun.-Jul. 1997.
- PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Geneva, New York, v.104, n.2, p.145-148, 1979.