

Maria das Graças Rodrigues FERREIRA¹, Carlos Henrique Siqueira de CARVALHO², Andréa Almeida CARNEIRO³ e Carlos Ferreira DAMIÃO FILHO⁴

¹ CENA/USP, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Av. Centenário, 303, Cx Postal 96. CEP - 13400-970, Piracicaba-SP. E-mail: mgf23@hotmail.com

^{2, 3} EMBRAPA MILHO E SORGO, Núcleo de Biologia Aplicada, Cx Postal 151. CEP - 35701-970, Sete Lagoas-MG.

⁴ UNESP, Jaboticabal, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. CEP - 14884-900, Jaboticabal-SP.

INTRODUÇÃO

O cupuaçzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é uma árvore frutífera, que encontra-se em estado silvestre por toda a Bacia Amazônica, sendo uma das fruteiras mais atrativas da região devido às características de sabor e aroma de sua polpa. Esta 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). O entendimento do processo de embriogênese somática desta espécie, além de auxiliar a produção de plantas elite, pode servir como base para futuros trabalhos de melhoramento, via transformação genética, visando a produção de plantas resistentes a doenças, como a vassoura de bruxa. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para indução de embriões somáticos de cupuaçu.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Biologia Aplicada, pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Foram empregadas folhas jovens totalmente expandidas, ainda flácidas, coletadas após a tonalidade avermelhada ter desaparecido. As mesmas foram esterilizadas com 20% de hipoclorito de sódio (alvejante comercial) durante 20 minutos, seguida de 3 lavagens com água bidestilada estéril. Os explantes, que consistiram de quadrados de folhas de aproximadamente 1 x 1 cm, foram cultivados em placas de Petri descartáveis (90 x 15 cm) e mantidos em sala de crescimento, intercalando luz e escuro a 28° C. Foram feitas 10 repetições com os seguintes meios: **Meio 1:** (50%) sais MS (Murashige e Skoog, 1962) (2,15 g/L) e vitaminas MS (1000 x) (1 mL/L), sacarose (3%), suplementados com BAP (6,0 mg/L), AIA (0,5 mg/L), semi solidificado com agar (8 g/L) e pH 6,0 antes da autoclavagem; **Meio 2:** (50%) sais MS (2,15 g/L), vitaminas MS (1000 x) (1 mL/L), TDZ (10 µM), sacarose (30 g/L), ágar (8 g/L), pH 6,0 antes da autoclavagem.

Estudo em microscopia eletrônica de varredura

As estruturas formadas foram fixadas a 4° C em glutaraldeído a 3%, lavadas em solução tampão pura por cinco vezes consecutivas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão e mesma temperatura, por cerca de 12 horas. Na sequência, foram novamente lavadas como no caso anterior, desidratadas em série gradual de etanol, secas em secador de ponto crítico utilizando-se CO₂, montadas, metalizadas com 35 nm de ouro-paládio, observadas e eletrônia-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado em 15 KV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o emprego do meio 1, o aparecimento dos calos ocorreu dentro de uma semana na região das nervuras. Resultados semelhantes foram obtidos por Abraham et al. (1992), empregando folhas tenras de cacau, com o objetivo de padronizar um meio de cultura adequado para

propagação vegetativa rápida através da embriogênese somática. Os calos foram mantidos no meio 1 durante 5 semanas, sendo subcultivados a cada duas semanas. Durante esse período, notou-se a proliferação de massa calosa em todo o explante, em forma de *cachos*, que murchavam, não ultrapassando esse estádio. Os explantes foram transferidos para o meio com TDZ e, após uma semana neste meio, verificou-se uma maior proliferação de calos, seguida da diferenciação de estruturas pró-embriogênicas na massa calosa. Estas tinham um aspecto globular, transparente e se tornavam mais densas, à medida que cresciam. Estruturas semelhantes foram verificadas por Shatters et al. (1994) em calos de *Paspalum notatum* Fluegge L. Subcultivos foram realizados a cada 15 dias e, após dois meses, as culturas foram transferidas para um meio de regeneração, a fim de estimular o completo desenvolvimento do embrião. Uma semana após transferência para este meio, observou-se que as estruturas estavam mais densas, com aspecto mais escuro e secaram. Assim, não foi possível estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos além desse estágio, contudo, ficou demonstrado o potencial morfogenético de folhas de cupuaçu. O aparecimento dessas estruturas pode ser devido a inclusão de TDZ no meio de cultura, um substituto da feniluréia comumente usado como desfolhante (Arndt et al., 1976), mas que tem mostrado exibir uma forte atividade semelhante à citocinina. Thomas e Katterman (1986) informaram que as auxinas críticas para indução de embriões podem ser sintetizadas pelo tecido cotiledonar ou foliar tratado com TDZ em modelo similar àquele descrito pela biossíntese de citocininas induzidas pelo TDZ.

Microscopia eletrônica

Estruturas semelhantes a embrióides apareceram em pequenos grupos ou em forma de *cachos* sobre a superfície de tecido foliar cultivado em meio com TDZ (Figura 1A, B). Duas semanas após a inoculação neste meio, verificou-se a formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos no estágio globular, ligadas ao tecido do explante por um suspensor (Figura 1C, D). Embrióides de cacau apresentando estruturas semelhantes a um suspensor também foram observadas por Esan (1977), Pence et al. (1980) e Kononowicz et al. (1984).

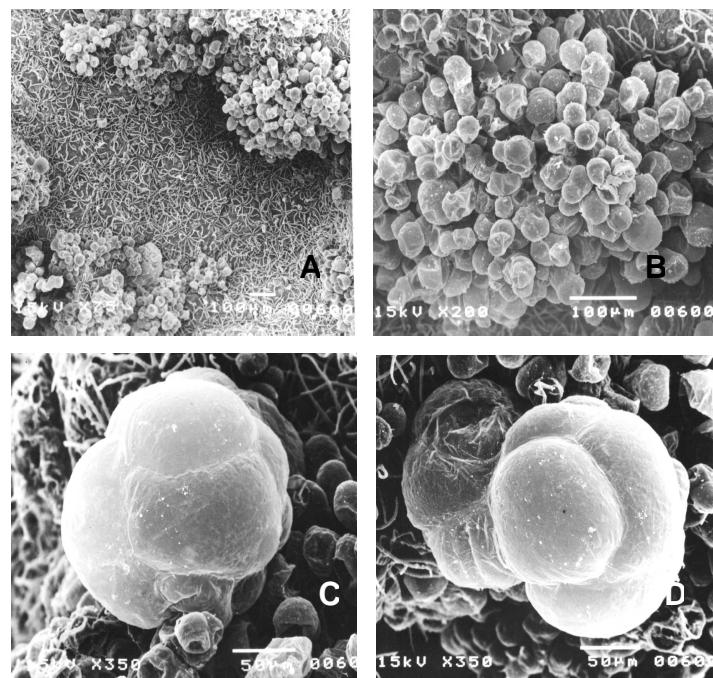


Figura 1. Fotomicrografias de estruturas semelhantes a embrióides de cupuaçu no estágio globular. A) Estruturas em forma de *cachos* sobre a superfície de tecido foliar; B) Detalhe de *cachos*; C) Estrutura com aparência de embrião somático no estágio globular ligado por suspensor e, D) Estrutura vista de cima.

CONCLUSÕES

- o potencial morfogenético de folhas de cupuaçu foi demonstrado;
- o aparecimento de estruturas embriogênicas pode ser devido inclusão de TDZ no meio de cultura;
- há necessidade de mais estudos para estimular a germinação e desenvolvimento de embriões somáticos de cupuaçu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, P.; SAJI, K. V.; IYER, R.D. In vitro studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) somatic embryogenesis from cotyledon explants. **Journal of Plantation Crops**, v. 20, n. 2, p. 110-113, 1992.

ARNDT, F.; RUSCH, R.; STILFRIED, H. V. SN 49537, a new cotton defoliant. **Plant Physiology**, n. 57, Suppl., p. 99, 1976.

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, H. M.; KAHWAGE, O M. da C. **Fruticultura Tropical**: o cupuaçzeiro, cultivo, beneficiamento e utilização do fruto, Belém: EMBRAPA/CPATU, 1984. p. 1-110. (Documento, 32).

ESAN, E. B. Régénération des pousses à partir de calle provenant de cultures axillaires d'embryons de *Theobroma cacao* in vitro. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE PESQUISAS CACAUEIRAS, 4., 1977, Ilhéus. p. 55-67.

KONONOWICZ, H.; KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. Asexual embryogenesis via *callus* of *Theobroma cacao* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 113, n. 4, p. 347-358, 1984.

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

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and developement of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. in vitro. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 98, n. 1, p. 1-14. 1980.

SHATTERS JR.; R.G.; WHEELER, R. A.; WEST, S. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *callus* cultures of “Tifton 9” Bahiagrass. **Crop Science**, v. 34, p. 1378-1384, 1994.

THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, v. 81, p. 681-683, 1986.

VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçzeiro. **Informativo SBF**, v. 4, n.1, 1985.