

INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM EXPLANTES DE CUPUAÇUZEIRO¹

MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES FERREIRA², FERNANDO ENRIQUE NINAMANGO CÁRDENAS³, CARLOS HENRIQUE SIQUEIRA DE CARVALHO⁴, ANDRÉA ALMEIDA CARNEIRO⁵, CARLOS FERREIRA DAMIÃO FILHO⁶

RESUMO - Objetivou-se a indução de calos embriogênicos em cupuaçuzeiro, em função do tipo de explante e meio de cultura. Foram testados como explantes, segmentos cotiledonares e eixos embrionários divididos em três partes: região da plúmula, radícula e hipocótilo. Os explantes foram cultivados em 2 diferentes meios de cultura: 1) MS suplementado com 2,4-D (1 mg L⁻¹) e Kinetina (0,25 mg L⁻¹); 2) MS acrescido de ANA (5 mg L⁻¹) e Kinetina (0,25 mg L⁻¹). Constatou-se que a região do hipocótilo foi a parte mais responsiva do eixo embrionário, formando calos com aspecto branco e friável. As auxinas testadas nos meios não estimularam o processo embriogênico em calos de cupuaçuzeiro.

Termos para indexação: Cultura de tecido, cupuaçu, *Theobroma grandiflorum*, auxina

INDUCTION OF EMBRYOGENICS CALLI IN CUPUASSU EXPLANTS

ABSTRACT - It was studied the induction of embryogenics calli in cupuassu, in function of kind of explant and culture medium. Cotyledons segments and embryonic axes were tested and divided in three parts: region of plumule, radicle and hypocotile. The explants were cultivated in two different culture medium: 1) MS supplemented with 2,4-D (1 mg L⁻¹) and Kinetin (0,25 mg L⁻¹); 2) MS supplemented with NAA (5 mg L⁻¹) and Kinetin (0,25 mg L⁻¹). The hypocotile region demonstrated to be more responsive segment of the embryonic axe, forming callus with white and friable aspect. No somatic embryogenesis was evidenced in callus of cupuassu with auxines testeds in the medium.

Index terms: Tissue culture, cupuassu, *Theobroma grandiflorum*, auxine

O cupuaçuzeiro é uma árvore frutífera da região amazônica, pertencente à família das Sterculiaceas. Encontra-se em estado silvestre na parte sul e sudeste da Amazônia Oriental e noroeste do Estado do Maranhão. Atualmente, o cupuaçuzeiro está disseminado por toda a bacia Amazônica, sendo esporadicamente encontrado em outros países, como Colômbia, Venezuela, Equador e Costa Rica (Venturieri et al., 1985).

A espécie possui polpa branco-amarelada, que se encontra aderida às sementes. Esta polpa de sabor ácido e aroma agradável característico é utilizada *in natura* ou na confecção 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 a obtenção do cupulate foi desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, em estudos conduzidos por Nazaré et al. (1990). A amêndoa entra na composição de chocolate branco, e a manteiga está sendo usada no preparo de amaciante de roupas. As características de sabor e aroma da polpa, somadas à facilidade de industrialização, fazem do cupuaçu uma das frutas mais atrativas da região, despertando interesse não só do mercado regional como nacional e até internacional.

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 a 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*). O entendimento do processo de embriogênese somática desta espécie, além de auxiliar a produção em larga escala de plantas-elite, pode servir como base para futuros trabalhos de melhoramento, via transformação genética, visando à produção de plantas resistentes a doenças, como a vassoura-de-bruxa, alta produção de frutos, rendimento de polpa e curto período de armazenamento do fruto. O objetivo do trabalho foi induzir *in vitro* a formação de calos embriogênicos em cupuaçuzeiro, em função do tipo de explante e meio

de cultura.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente à UNESP, Jaboticabal-SP. Foram testados como fonte de explantes, cotilédones e eixos embrionários, obtidos de sementes extraídas de frutos de cupuaçu próximos à maturidade, das variedades Mamorana e Redondo. O material foi adquirido junto ao Centro de Pesquisa da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Itabuna, Bahia. As sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, durante 10 minutos, seguida de três lavagens com água bidestilada. Os eixos embrionários foram retirados das sementes e divididos em três partes: região da plúmula, radícula e hipocótilo. Os cotilédones foram também seccionados em segmentos de 1,0 e 1,5 cm. Posteriormente, esses explantes foram desinfetados de duas maneiras: 1) imersão em solução contendo 30 ml de hipoclorito de sódio (alvejante comercial – 5,27%), 70 ml de água destilada e 3 gotas de Tween 20. Em seguida, os explantes foram lavados 3 vezes com água bidestilada estéril; 2) desinfestação com solução Ao (antioxidante), composta de ácido ascórbico (15 mg/L), cisteína (40 mg/L) e AgNO₃ (2 mg/L)- contendo 30 ml de alvejante comercial, 60 ml de água destilada, 10 ml de solução Ao e 3 gotas de Tween 20. Os explantes ficaram imersos nessa solução por 1 hora e, posteriormente, foram imersos em solução de 9 ml LS (Linsmaier & Skoog, 1965) + 1 ml Ao.

Para condição, foram feitas 10 repetições empregando os seguintes meios:

- **Meio 1:** sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas, sacarose (4%), suplementados com L- leucina (0,4 mg L⁻¹), L- lisina (0,4 mg L⁻¹), L- triptofano (0,2 mg L⁻¹), L-arginina (0,4 mg L⁻¹), 2,4-D (1 mg L⁻¹), Kinetina (0,25 mg L⁻¹), Glicina (3 mg L⁻¹), água de coco (50 ml L⁻¹) e semi-solidificado com Gelrite (2 g L⁻¹) e pH 5,5 antes da autoclavagem; **Meio 2:** sais MS, vitaminas, sacarose (4%), suplementados com L- leucina (0,4 mg L⁻¹), L- lisina (0,4 mg L⁻¹), L- triptofano (0,2 mg L⁻¹), L-arginina (0,4 mg L⁻¹), ANA (5 mg L⁻¹), Kinetina (0,25 mg L⁻¹), Glicina (3 mg L⁻¹), água de coco (50 ml L⁻¹) e semi-solidificado com Gelrite (2 g L⁻¹) e pH 5,5 antes da autoclavagem.

Os explantes foram colocados em tubos de ensaio do tamanho 25x150 mm, contendo 15 mL de meio em cada tubo, sendo cultivados em

¹ (Trabalho 120/2003). Recebido: 05/09/2003. Aceito para publicação: 09/08/2004. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

² EMBRAPA Rondônia, BR 364, km 5,5, Cx Postal 406, Porto Velho-RO, CEP - 78.970-900. e-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br.

³ ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, CEP - 13400-970, Piracicaba-SP. e-mail: fenc@ciagri.usp.br.

⁴ Fundação Pró-café, Alameda do Café, 1000, CEP - 37026-400, Varginha-MG. e-mail: carlos@varginha.br

⁵ EMBRAPA Milho e Sorgo, Núcleo de Biologia Aplicada, Cx Postal 151, CEP - 35701-970, Sete Lagoas-MG. e-mail: andreac@cnpmis.embrapa.br.

⁶ Depto. de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal-SP, CEP- 14870-000. e-mail: damiao@fcav.unesp.br.

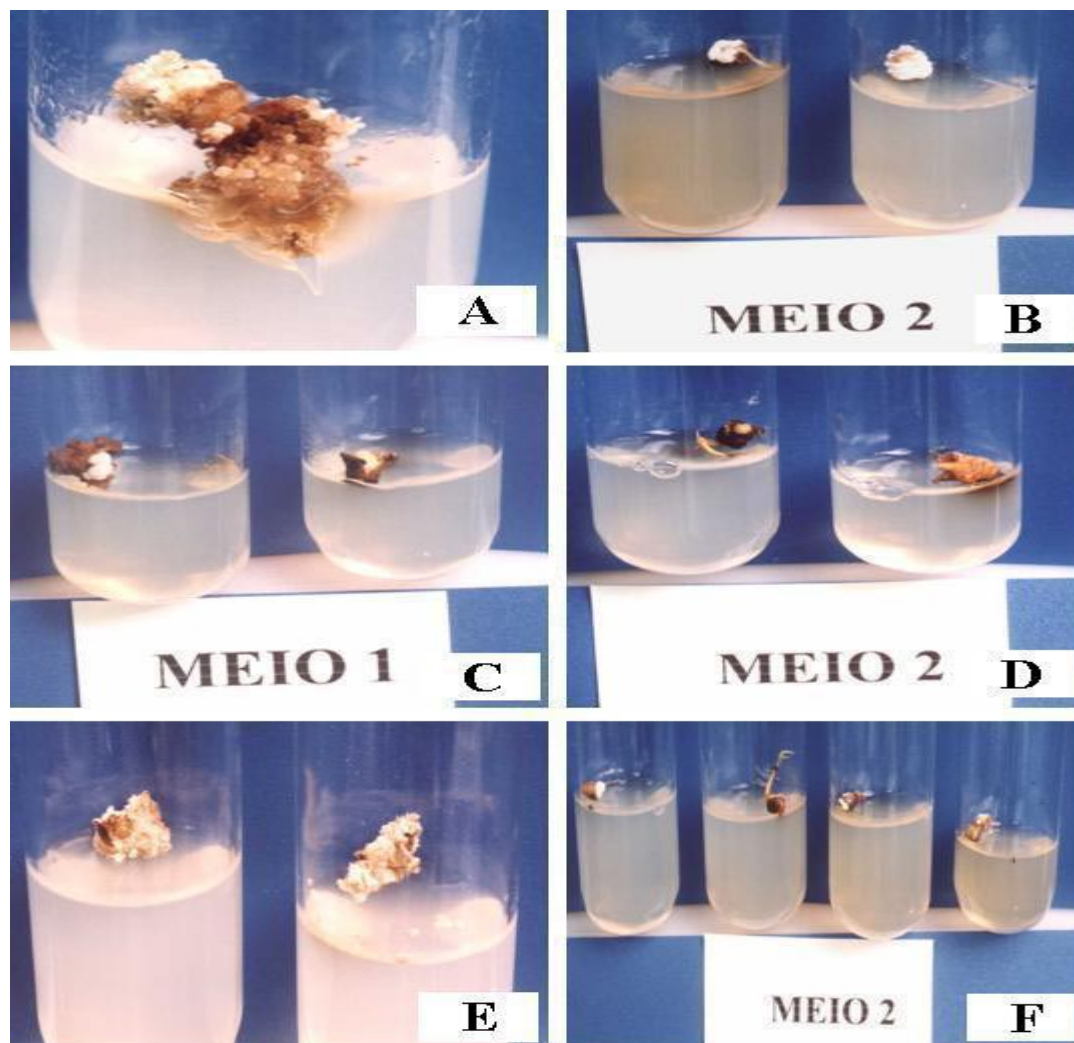


FIGURA 1 - Indução de calos em segmentos de eixo embrionário de cupuacuzeiro. A) Calos da região do hipocótilo cultivados no meio 1 (2,4-D e cinetina); B) Calos da região do hipocótilo no meio 2 (ANA e cinetina); C) Calos da região apical no meio 1; D) Calos da região apical no meio 2; E) Calos da região da raiz cultivados em meio 1; F) Calos da região da raiz cultivados em meio 2.

sala de crescimento, no escuro, a 28°C. O experimento foi conduzido por seis semanas após o explantio, sendo realizados três subcultivos, ao final dos quais foram observadas as respostas dos explantes às combinações de auxina nos meios testados.

Após seis semanas, observou-se que nenhum calo foi formado, quando se empregaram, como explante, segmentos de cotilédones em qualquer um dos meios testados, o que pode ser justificado pela idade dos explantes empregados, pois as sementes foram extraídas de frutos próximos à maturidade. Assim, é sugerido que sejam testados segmentos cotiledonares retirados de frutos imaturos. Esan (1975) afirmou ser o cotilédone a parte mais facilmente ativa do embrião. Abraham et al. (1992), em estudos com cacauzeiro, verificaram que os cotilédones foram os explantes mais responsivos em termos de indução de calo, seguido por embriogênese somática.

A indução de calo foi mais precoce na região do hipocótilo de eixo embrionário, em relação à região apical e da radícula. O meio MS acrescido de 2,4-D promoveu a formação de calos grandes, com aspecto branco e friável, mas, após três subcultivos, cessaram o desenvolvimento e escureceram. Já o meio MS acrescido de ANA apresentou calos menores, com a mesma aparência, acompanhados de emissão radicular (Figura 1A, B). Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2001) em estudo do efeito da concentração de auxina e do meio líquido sobre o desenvolvimento de calos de cupuacu.

Para segmentos de eixo apical, o meio MS acrescido de ANA e cinetina formou raízes e induziu a parte aérea com pouca formação de calos. Quando se empregou o meio MS acrescido de 2,4-D e cinetina, observou-se também indução da parte aérea em alguns explantes e formação de calos pequenos, brancos, que, com o tempo, se tornavam marrons e cessavam o desenvolvimento (Figura 1C, D). Para segmentos

radiculares, observaram-se, no meio que continha ANA e cinetina, emissão de raízes e massa calosa de cor branca em partes do explante. O meio acrescido de 2,4-D e cinetina promoveu a formação de calos grandes, com aumento distinto do tamanho do explante (Figura 1E, F).

Nos meios suplementados com ANA, percebeu-se a emissão de raízes e pouca formação de calos em todos os explantes empregados, concordando com os resultados de Legrand et al. (1984), utilizando explantes de *Theobroma cacao*. Os autores verificaram que a calogênese e a rizogênese foram promovidas por ANA ou água de coco, de acordo com o tipo de explante. Pence et al. (1980), em experimentos com embriões zigóticos imaturos de cacauzeiro, concluíram que a combinação de auxinas (ANA, AIA e 2,4-D) e água de coco estimula a embriogênese, porém a adição de cada uma separadamente teve pouco efeito no processo embriogênico. Tsai & Kinsella (1981) obtiveram calos de cacauzeiro, empregando sementes frescas imaturas e oriundas de frutos colhidos entre 120 e 130 dias após a polinização. A água de coco melhorou substancialmente o crescimento de calos, o que foi atribuído a substâncias promotoras de crescimento. Os calos definharam quando o meio MS foi suplementado com água de coco e ANA (0,5-2 mg L⁻¹).

No presente estudo, os explantes cultivados em meio com 2,4-D produziram calos grandes, que se tornaram marrons e morreram com o tempo. Isso pode ser atribuído à combinação de água de coco com 2,4-D. Resultados semelhantes foram obtidos por Kononowicz et al. (1984), descrevendo o processo de embriogênese assexual, a partir de calos originados de embriões zigóticos imaturos de cacau. Concluíram que a auxina exógena não é essencial para a indução de embriões, mas a baixa concentração de auxina estimula a embriogênese. Por outro lado, o aumento da concentração de auxina, especialmente na presença de água de coco, promove a formação de calos. Os autores observaram ainda

que a água de coco, sem adição de reguladores de crescimento, estimulou a embriogênese assexual de calos, mas, em geral, a combinação de água de coco com 2,4-D deprimiu esta característica.

Pesquisas com essa espécie do gênero *Theobroma* são ainda bastante incipientes e não há resultados conclusivos, pois a literatura sobre embriogênese somática em cupuaçu é escassa. Ainda não se dispõe de protocolos de micropropagação que possibilitem a obtenção de *plantlets*. Tentativas com a embriogênese somática possibilitaram apenas a obtenção de calos embriogênicos que falharam na produção de *seedlings* viáveis (Velho et al., 1990). Alguns trabalhos têm mostrado a capacidade de diferentes explantes de cupuaçu em formar calos, bem como a diferenciação de estruturas embriogênicas. Rodrigues (2000) não verificou a formação de calos em segmentos nodais de cupuaçu em meio suplementado com diferentes concentrações de 2,4 D. Ledo et al. (2002) avaliaram as respostas morfogenéticas de diferentes explantes de cupuaçu submetidas a várias condições de cultura *in vitro*. Os autores afirmam que a ausência de indução de calos embriogênicos observada nas culturas pode estar relacionada com diversos fatores, como tipo e estágio de desenvolvimento dos explantes, meio de cultura e tipo e concentração de reguladores de crescimento.

Nas condições em que foi feito este experimento, concluímos que a região do hipocótilo demonstrou ser a parte mais responsiva do eixo embrionário de cupuaçu, formando calos com aspecto branco e brilhante; as auxinas testadas nos meios não estimularam o processo embriogênico em calos de cupuaçu; outras concentrações de sacarose devem ser testadas, além de outras fontes de carbono que estimulem o processo de formação de calos embriogênicos 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**, Kerala, v. 20, n. 2, p. 110-113, 1992.
- 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 (Documento, 32).
- ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L) - supplementation of current research. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 5., 1975, Ibadan. **Proceedings...** p. 116-125.
- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 473-476, 2001.
- 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.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, no.3, p.604-607, 2002.
- 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.
- LINSMAIER E.M., SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, p. 100, 1965.
- LITZ, R.E. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In: DIMICK, P. S. (Ed.) CACAO BIOTECHNOLOGY SYMPOSIUM, 1986, **Proceedings...** College of Agriculture: Pennsylvania State University, 1986. p. 111-120.
- 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. 440p. (Documentos, 89).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1990. 38p. il. (Boletim de pesquisa, 108).
- PENCE, V.C; HASEGAWA, P. M; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. in vitro. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 98, n. 1, p. 1-14, 1980.
- RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento do eixo embrionário in vitro e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius)**. 2000. 70f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- TSAI, C. H.; KINSELLA, J. E. Initiation and growth of callus and cell suspensions of *Theobroma cacao* L. **Annals of Botany**, London, v. 48, p. 549-557, 1981.
- VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Cupuassu: a new beverage crop for Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM NEW CROPS: RESEARCH, DEVELOPMENT, ECONOMICS, 1., 1990, Portland. **Proceedings...** Portland: Timber Press, 1990. p. 372-375.
- VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O cultivo do cupuaçuzeiro. **Informativo SBF**, Campinas, v. 4, n. 1, 1985.