



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM EXPLANTES DE CUPUAÇU

Caroline Fonseca Almeida¹, Simone de Miranda Rodrigues², Oriel Filgueira de Lemos³

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: caroline.bio07@gmail.com

²Orientadora/Pesquisadora Dra. da Embrapa Amazônia Oriental

³Pesquisador/Dr. da Embrapa Amazônia Oriental

Resumo: Alguns trabalhos foram realizados aplicando-se técnicas de cultura de tecidos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.), entretanto foram obtidos apenas a pré-formação de embriões somáticos de cupuaçu, a partir de calos, não conseguindo obter embriões somáticos bem formados e plântulas viáveis. Ainda torna-se necessário desenvolver pesquisas com esta valiosa espécie do gênero *Theobroma*, pois sua expansão econômica é dificultada devido à falta de uma seleção e multiplicação eficiente de plantas resistentes à vassoura-de-bruxa. Assim, este trabalho teve como objetivo obter o desenvolvimento de calos de cupuaçu, visando adequar um protocolo de micropropagação para essa espécie, de acordo com protocolos eficientes desenvolvidos para *Theobroma cacao*. Estaminóides e pétalas de cupuaçu, genótipo 174 e 286, foram coletados e desinfestados antes de serem inoculados em meio de crescimento primário de calo (sais e vitaminas DKW). Esses explantes foram mantidos no escuro por 14 dias, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ antes da transferência para meio de crescimento secundário de calo (sais WPM e vitaminas de Gamborg). Após 14 dias de cultivo nessas condições, as culturas foram transferidas para os meios de desenvolvimento de embrião, sendo subcultivadas a cada 14 dias. Os experimentos foram avaliados quanto à intensidade de oxidação e calogênese dos explantes. O genótipo 174 respondeu primeiro em relação ao genótipo 286, e a oxidação foi controlada nos explantes com o uso do PVP.

Palavras-chave: calogênese, micropropagação, *Theobroma grandiflorum*

Introdução

A produção de cupuaçu no Brasil, em 2005, chegou perto da casa de 200 milhões de frutas. A média de produtores de cupuaçu no país chega a 170 mil pessoas, o que gera aproximadamente, 220 mil empregos diretos e indiretos. Sua produção está mais concentrada nos estados da região Norte, sendo o Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Roraima os maiores produtores da fruta no Brasil. A Bahia também tem uma larga produção, entretanto em escala menor. O maior valor da espécie está na sua



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

polpa, encontrada aderida às sementes, de cor branco-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., 1982). Da sua semente extraí-se um produto semelhante ao chocolate, caseiro ou industrial, de ótima qualidade, recebendo o nome de cupulate. Essa tecnologia de obtenção do cupulate foi desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, em estudos conduzidos por Nazaré et al. (1990). O grande problema da expansão dessa cultura é a doença vassoura-de-bruxa. Uma alternativa para contornar tal problema seria a propagação clonal das espécies tolerantes a essa doença, via indução de calos embriogênicos, visando a produção de embriões somáticos, para a obtenção de plantas superiores e morfologicamente uniformes. O conhecimento do processo de embriogênese somática do cupuaçu é importante para auxiliar na produção de plantas-elite, servindo como base para futuros trabalhos de melhoramento, focados na produção de plantas resistentes a moléstias, como a vassoura-de-bruxa, alta produção de frutos, rendimento de polpa e curto período de armazenamento do fruto. Estudos realizados de propagação *in vitro* para o gênero *Theobroma* têm-se limitado à espécie *Theobroma cacao* L., há pouco tempo considerado como a única espécie do gênero cultivada comercialmente. Assim, devido à familiaridade botânica com o cacau, espera-se que protocolos de micropropagação já estabelecidos para cacau possam ser adaptados para o cupuaçu. O objetivo deste trabalho foi obter e estudar o desenvolvimento de calos embriogênicos de cupuaçu para estabelecer um protocolo de micropropagação para essa espécie.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pa. Estaminóides e pétalas, utilizados no desenvolvimento dos experimentos foram coletados de botões florais maduros de cupuaçu dos genótipos 286 e 174, provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental e usados como fonte de explante. Após a coleta, sempre pela manhã, a assepsia dos botões foi realizada através de lavagens com detergente comercial e água corrente antes de serem levados para câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestados em álcool 70% por 1 minuto. Em seguida, os botões florais foram colocados por 12 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% com 2 gotas de tween-20 (20 gotas/100ml), seguido de cinco lavagens com água destilada autoclavada. Com o auxílio de bisturi, os botões foram abertos para a excisão das pétalas e dos estaminóides, os quais foram imersos em ácido cítrico (50 M) até a inoculação em meio de cultura. Quatro experimentos foram realizados. No 1º experimento, as pétalas e estaminóides foram inoculados primeiramente em meio PCG, contendo sais e vitaminas



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

DKW (McGranahan et al., 1987), suplementado com inositol 100 mg.l⁻¹; 2,4 D 2 mg.l⁻¹; TDZ 0,005 mg.l⁻¹; glutamina 250 mg.l⁻¹; sacarose 30 g.l⁻¹; fitagel 2 g.l⁻¹; pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas no escuro por 14 dias, à temperatura de 25 ± 2°C, e então transferidas para o Meio SCG 2, constituído de sais WPM (Lloyd & McCown, 1980), vitaminas de Gamborg; sacarose 30 g.l⁻¹; 2,4 D 2 mg.l⁻¹; BAP 0,05 mg.l⁻¹; fitagel 2,2 g.l⁻¹ e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, mantidas por 14 dias nas mesmas condições anteriores. Após esse período foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embrião ED 3s/g, adaptado de Li et al. (1998), constituído de sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose 30 g.l⁻¹; inositol 100 mg.l⁻¹; PVP 0,4 g.l⁻¹(antioxidante); solidificado com 2 g.l⁻¹ de fitagel e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. As culturas permaneceram no escuro, à temperatura de 25 ± 2°C, sendo transferidas para meio ED 4s/g a cada 14 dias, constituído de sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose 40 g.l⁻¹; inositol 100 mg.l⁻¹; solidificado com 2 g.l⁻¹ de fitagel; PVP 0,4 g.l⁻¹(antioxidante) e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. O 2º experimento consistiu na inoculação dos explantes no mesmo meio de cultivo, acrescentando-se carvão ativado no meio, sendo mantidos nas mesmas condições de cultivo. O 3º experimento consistiu na inoculação dos explantes no mesmo meio de cultivo, adicionando-se PVP aos meios de cultura desde o início da inoculação; enquanto o 4º consistiu do uso do mesmo meio de cultura, adicionando-se carvão ativado apenas nos primeiros 14 dias após a inoculação dos tecidos vegetais. Os experimentos foram avaliados de 5 em 5 semanas a partir da data de inoculação. Foram feitas 4 avaliações em cada experimento, considerando-se a porcentagem de frascos que apresentou resposta *in vitro* de pelo menos um explante. Os resultados foram analisados de acordo com a intensidade de oxidação e resposta calogênica *in vitro* dos explantes.

Resultados e Discussão

A avaliação dos experimentos foi feita mediante observação dos frascos que apresentaram desenvolvimento de calos de pelo menos um explante, e a alteração na intensidade de oxidação. Apenas os estaminóides apresentaram respostas visíveis *in vitro*. A oxidação dos estaminóides e das pétalas foi controlada com o uso do PVP. O genótipo 174 começou a apresentar as primeiras respostas depois de 31 dias de inoculados, enquanto o genótipo 286 apresentou as respostas a partir do 42º dias após a inoculação.

Os resultados observados no 1º experimento até a sua 4ª avaliação mostrou que 40% dos frascos inoculados com estaminóides responderam, sendo que entre esses 66,6% apresentaram calos com desenvolvimento inicial de aspecto não-friáveis, bem compactados e coloração marrom escuro;



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

22,2% dos calos apresentaram desenvolvimento médio e características de calos friáveis, com coloração marrom-claro, brilhosos e moles, enquanto os outros 11,2% apresentaram calos com desenvolvimento abundante, com característica de calo não-friável, coloração marrom-escuro e de consistência mole. Com relação à oxidação no 1º experimento, observou-se leve oxidação dos explantes apenas no 1º mês de cultivo, pois foi adicionado antioxidante (PVP) no meio ED 3s/g, solucionando o problema. O experimento 2º não apresentou respostas de desenvolvimento de calos, sendo descartado após 60 dias de inoculação, devido à alta intensidade de oxidação. No 3º experimento 86,6% do material inoculado respondeu até a 3ª avaliação, sendo que desses 30,8% apresentaram calos com desenvolvimento inicial com característica friável; 53,8% apresentaram desenvolvimento médio de calos com característica não-friáveis e 15,4% com desenvolvimento abundante de calos não-friáveis. Os calos obtidos foram transferidos para meios DKW com diferentes concentrações de Dicamba, mas não apresentaram resposta quanto à multiplicação ou a diferenciação dos calos. O 4º experimento, após 14 dias de inoculação, apresentou baixa intensidade de oxidação, entretanto não foi observado desenvolvimento dos explantes em calo.

Conclusões

A calogênese apresentou-se como um processo influenciado pelo genótipo. Os estaminóides se mostraram como ótima fonte de explante para obtenção de calos.

O carvão ativado não mostrou eficiência contra oxidação dos explantes, sendo o PVP a melhor alternativa para controlar a oxidação de explantes de cupuaçu.

Referências Bibliográficas

CALZAVARA, B.B.G. **O cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Belém. (s.n.), 11 p. (Série Cultivos Pioneiros). 1982.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

McGRANAHAN, G.H.; DRIVER, J.A.; TULECKE, W. Tissue culture of Juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v.3, p. 261-271.

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).